



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS*: SUA
UTILIZAÇÃO COMO CULTURAS DE ARRANQUE EM ENCHIDOS FERMENTADOS SECOS
E FUMADOS

LAURA MARIA CENTENO PINTO QUERIDO DE CARVALHO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto
Doutor Miguel Nuno Geraldo Viegas dos Santos Elias
Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS*: SUA
UTILIZAÇÃO COMO CULTURAS DE ARRANQUE EM ENCHIDOS FERMENTADOS SECOS
E FUMADOS

LAURA MARIA CENTENO PINTO QUERIDO DE CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto
Doutor Miguel Nuno Geraldo Viegas dos Santos Elias
Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2010

LISBOA

Agradecimentos e Dedicatória

A todos aqueles que confiaram no meu trabalho, me deram força quando estava desmotivada e acreditaram na minha capacidade em concretizar este objectivo.

Ao meu pai que passou muitos fins-de-semana sem a minha presença.

À minha mãe que apesar de não estar fisicamente entre nós, o estará sempre em pensamento.

Aos meus filhos e ao meu marido pela força que sempre me transmitiram.

À Professora Doutora Maria João Fraqueza pela orientação, disponibilidade, competência e rigor no apoio prestado.

À Equipa Técnica do Laboratório de Tecnologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa pela disponibilidade, simpatia e ajuda prestada.

À Professora Doutora Teresa Semedo e seu marido pelo apoio e disponibilidade demonstrada.

“Os sonhos dos grandes sonhadores jamais chegam a cumprir-se, são sempre superados”

Alfred North Whitehead

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS*: SUA UTILIZAÇÃO COMO CULTURAS DE ARRANQUE EM ENCHIDOS FERMENTADOS SECOS E FUMADOS

RESUMO:

O objectivo deste trabalho foi caracterizar a microbiota estafilocócica tecnológica obtida de produtos cárneos fermentados tradicionais e do ambiente fabril correspondente, a fim de avaliar o seu potencial uso como cultura starter. Cento e quatro isolados de *Staphylococcus* spp. previamente identificados por provas bioquímicas, obtidos de diferentes origens e pontos de colheita do ambiente fabril e chouriço de duas unidades fabris (A e B), localizadas no Sul de Portugal, foram submetidos a análise através de metodologias PCR para confirmação genética do gênero e espécies (*S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. equorum*, *S. carnosus* e *S. epidermidis*). Dos quarenta e sete isolados de *Staphylococcus* pertencentes à Unidade Fabril A dominava o *S. equorum* enquanto os restantes cinquenta e sete pertencentes à Unidade Fabril B eram maioritariamente compostos por *S. xylosus*.

Os perfis genéticos dos isolados foram comparados por PCR fingerprinting e a análise por utilização do software BioNumerics levou à seleção de 43 *Staphylococcus*. Estas estirpes foram caracterizadas quanto à actividade nitrato redutase, actividade lipolítica e proteolítica, a fim de avaliar o seu interesse tecnológico. Trinta por cento das estirpes apresentaram actividade proteolítica, enquanto quarenta e dois por cento apresentaram actividade lipolítica. Quanto à actividade nitrato redutase verificou-se que cerca de 65% das estirpes estudadas reduzia o nitrato. Representantes seleccionados (n = 10) de grupos com perfil genético diferente foram caracterizados quanto à capacidade de crescimento em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio, a fim de avaliar a sua utilização como cultura starter.

Estirpes de *S. xylosus* e *S. equorum* (n = 10) cresceram em todas as condições de análise sendo no entanto o mesmo mais efectivo a 15 ° C e 20 ° C, pH 5,5 a 20 ° C e 10% e 15% de concentração de cloreto de sódio, encontrando-se assim garantidas as condições para a sua aplicação em processos tecnológicos com temperaturas variáveis.

As estirpes de *S. carnosus* P05-58 e *S. equorum* P05-74 da Unidade Fabril A e estirpes de *S. xylosus* P06-01 e P06-26, demonstraram ser, pelas suas características, as mais interessantes do ponto de vista tecnológico para serem utilizadas como flora iniciadora.

PALAVRAS CHAVE: *Staphylococcus* coagulase negativa, produtos cárneos fermentados, *starters*, atividade proteolítica, atividade lipolítica, atividade nitrato redutase.

ABSTRACT:

The aim of this work was to characterize the *staphylococci* technological microbiota obtained from traditional fermented dry sausages and the corresponding environment workshops, in order to evaluate their potential use as starters. One hundred and four *Staphylococcus* spp. isolates previously identified by biochemical tests, obtained from different sources and sampling points of the manufacturing environment and traditional fermented Portuguese sausage (chouriço) from two workshops A and B, located in Southern Portugal, were analyzed by PCR methods for genetic confirmation of genus and species (*S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. equorum*, *S. carnosus* and *S. epidermidis*). Forty-seven *staphylococci* from unit A were allocated to the dominating species *S. equorum* while the remaining fifty-seven belonging to unit B were mainly composed of *S. xylosus*.

The genetic profiles of the isolates were compared by PCR fingerprinting and the analyses using the BioNumerics software lead to the selection of 43 *staphylococci*. These strains were characterized for their nitrate reductase, lipolytic and proteolytic activity in order to evaluate their technological interest. Thirty percent of the strains showed proteolytic activity while forty-two percent had lipolytic activity. Regarding the nitrate reductase activity, it was found that about 65% of the strains under study reduced nitrate.

Representatives of genetic profile groups (n=10) were also evaluated for growth capacity in different conditions of temperature, pH and sodium chloride concentration in order to evaluate their use as starter cultures. *S. xylosus* and *S. equorum* strains (n=10) grew under all the conditions under analysis however, they seem to be more successful at 15 ° C and 20 ° C, pH 5.5 at 20 ° C and 10% and 15% sodium chloride concentration, which guarantees their application in sausage technological processes with varying temperatures.

From the technological point of view leading towards future application as starter cultures, the strains *S. carnosus* P05-58 and *S. equorum* P05-74, from workshop A, and strains *S. xylosus* P06-01 and P06-26, from workshop B, demonstrated to be the most interesting.

Key words: *Staphylococcus* coagulase negative, fermented meat products, starters, proteolytic activity, lipolytic activity, nitrate reductase activity.

Índice	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS:	viii
Capítulo I: Introdução	1
1.1. A origem dos enchidos – Perspectiva histórica	3
1.2. Os enchidos em Portugal	4
1.3. Enchidos fermentados secos	4
1.4. Classificação dos enchidos fermentados	6
1.4.1 – Enchidos fermentados portugueses	7
1.5. Fabrico dos enchidos; factores que condicionam o seu fabrico	8
1.5.1. Matérias-primas	8
1.5.1.1. Carne	8
1.5.1.2. A gordura	10
1.5.1.3. Outras matérias-primas não cárneas	10
1.5.1.4. Água e outros excipientes	10
1.5.1.5. Principais ingredientes	11
1.5.1.5.1 Sal	11
1.5.1.5.2. Sais de cura	13
1.5.1.5.3. Açúcares	14
1.5.1.5.4. Acidificantes	14
1.5.1.5.5. Especiarias	14
1.5.1.6. Outros ingredientes	16
1.5.1.7. Invólucros	16
1.5.1.8 Culturas de arranque (starters)	17
1.5.2. Processo de fabrico	19
1.6. Família das <i>Micrococcaceae</i>	21
1.6.1. Caracterização dos <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	22
1.6.1.1. Generalidades	22
1.6.1.2. <i>Staphylococcus carnosus</i>	22
1.6.1.3. <i>Staphylococcus simulans</i>	23
1.6.1.4. <i>Staphylococcus equorum</i>	24
1.6.1.5. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	24
1.6.1.6. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
1.6.1.7. <i>Staphylococcus xylosus</i>	26
1.7. Provas de interesse tecnológico	26
1.7.1. Actividade nitrato redutase	26
1.7.2. Actividade lipolítica e proteolítica	27
1.8. Formação de Nitrosaminas por acção microbiana	28
Capítulo 2: Materiais e Métodos	31
2.1. Origem dos isolados em estudo	31
2.2. Colheita das amostras e isolamento de <i>Staphylococcus spp</i>	31
2.3. Conservação de isolados	32
2.4. Cultivo para revivificação	32
2.5. Caracterização fenotípica dos isolados	32
2.5.1. Observação visual da morfologia das colónias	32
2.5.2. Prova da Catalase	32
2.5.3. Prova da Oxidase	33

2.5.4. Observação microscópica de esfregaços de colónias bacterianas: coloração de Gram.....	33
2.5.5. Critérios de selecção de estirpes	33
2.6. Identificação genotípica.....	34
2.6.1. Cultura de isolados em estudo.....	34
2.6.2. Extracção do DNA genómico	34
2.6.3. Quantificação e avaliação da pureza de DNA genómico total por espectrofotometria UV	35
2.6.4. Identificação genética de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	35
2.6.5. Identificação de <i>Staphylococcus carnosus</i> e <i>Staphylococcus simulans</i>	37
2.6.5.1. Amplificação de fragmento de DNA para identificação de <i>Staphylococcus simulans</i>	37
2.6.5.2. Amplificação de fragmento de DNA para identificação de <i>Staphylococcus carnosus</i>	38
2.6.6. Identificação de fragmento de DNA para identificação de <i>Staphylococcus equorum</i>	38
2.7. PCR fingerprinting	39
2.8. Selecção dos isolados para provas de interesse tecnológico	40
2.9. Provas de interesse tecnológico	40
2.9.1. Determinação da Actividade proteolítica	40
2.9.2. Determinação da Actividade lipolítica.....	40
2.9.3. Determinação da actividade nitrato redutase	41
2.9.4. Determinação do efeito da temperatura, pH e cloreto de sódio.....	41
2.10. Análise estatística.....	42
Capítulo 3: Apresentação de resultados.....	43
3.1. Caracterização fenotípica dos isolados: morfologia das colónias e utilização do manitol	43
3.2. Identificação genotípica de Isolados	45
3.3. PCR fingerprintings.....	53
3.4. Comparação entre os resultados obtidos por identificação fenotípica e genotípica de isolados de <i>Staphylococcus</i>	60
3.5. Provas de interesse tecnológico	61
3.5.1. Actividade proteolítica.....	62
3.5.2. Actividade lipolítica.....	66
3.5.3. Actividade nitrato redutase	69
3.6 – Evolução do crescimento de estirpes de <i>Staphylococcus</i> sujeitas a diferentes condições de temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio	74
3.6.1 – Efeito da temperatura.....	83
3.6.3 – Efeito do Cloreto de sódio.....	86
Capítulo IV: Discussão	89
Capítulo V: Conclusões e Perspectivas futuras	100
Bibliografia	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Isolados P06-14 (A) e P06-52 (B) de <i>Staphylococcus</i> spp. que evidenciaram uma utilização lenta do meio Manitol Salt Agar	43
Figura 2 - Isolado <i>Staphylococcus</i> P06-36 que não utilizou o manitol.....	44
Figura 3 - Isolado <i>Staphylococcus</i> P06-47 que fermentava o manitol.....	44
Figura 4- Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> e <i>Staphylococcus saprophyticus</i> e <i>Staphylococcus</i> spp pela técnica Multiplex PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.....	46
Figura 5 - Identificação de <i>Staphylococcus carnosus</i> pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.....	47
Figura 6 - Identificação de <i>Staphylococcus simulans</i> pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.....	47
Figura 7 - Identificação de <i>Staphylococcus equorum</i> pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.....	48
Figura 8 –PCR <i>fingerprinting</i> de estirpes de <i>Staphylococcus</i> em estudo.....	53
Figura 9 – Dendrograma da análise do perfil genético obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> das estirpes de <i>Staphylococcus carnosus</i> (A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança obtido).....	54
Figura 10 – Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus saprophyticus</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> (A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de <i>clusters</i>)-	55
Figura 11– Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus epidermidis</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> . A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de <i>clusters</i>	56
Figura 12 – Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus equorum</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> . A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de <i>clusters</i>	57
Figura 13 – Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus xylosus</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> . A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de <i>clusters</i>	58
Figura 14– Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus</i> spp obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> (A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de <i>clusters</i>).....	59
Figura 15 – Exemplo de estirpes de <i>Staphylococcus</i> em estudo (A) e de referência (B) com e sem actividade proteolítica no meio de cultura	63
Figura 16 – Exemplo de estirpes de <i>Staphylococcus</i> em estudo (A) e estirpes de referência (B e C) com e sem actividade lipolítica	66
Figura 17 - Exemplo de estirpes de <i>Staphylococcus</i> em estudo a diferentes condições: 30°C/7 horas (A) e 20°C/24 horas (B).....	69
Figura 18 - Efeito da temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio nas estirpes padrão em estudo	75
Figura 19 - Efeito da temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio das estirpes de <i>Staphylococcus xylosus</i> seleccionadas (P06-01, P06-17, P06-78, P06-95, P06-97, P06-102). ..	78
Figura 20- Efeito da temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio das estirpes de <i>Staphylococcus equorum</i> seleccionadas (P05-02, P05-13, P05-26, P05-74).....	81

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos enchidos baseada no valor de a_w (adaptado de Lucke, 1998 citado por Juarez, 2005).....	7
Tabela 2: Primers utilizados na reacção PCR multiplex para identificação das espécies <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> e <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	36
Tabela 3: Tamanho dos fragmentos amplificados para identificação das espécies <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> e <i>Staphylococcus xylosus</i>	37
Tabela 4 - Fermentação do manitol pelos isolados de <i>Staphylococcus</i> em função das Unidades Fabris	44
Tabela 5 – Identificação de estirpes relacionadas com as indústrias de salsicharia de origem.	49
Tabela 6 – Distribuição dos isolados identificados na Unidade Fabril A pelos pontos de colheita: massa de enchido tradicional fermentado e fumado (chouriço), ingredientes secundários (tripa) e superfícies de trabalho (caixa, câmara de refrigeração, máquina de enchimento, mesa e faca)	50
Tabela 7 – Distribuição dos isolados identificados na Unidade Fabril B pelos pontos de colheita: massa de enchido tradicional fermentado e fumado (chouriço), ingredientes secundários (alho e tripa) e superfícies de trabalho (picadora)	51
Tabela 8 – Identificação genotípica versus capacidade de fermentação do manitol.....	52
Tabela 9 – Comparação entre a identificação fenotípica e a identificação genotípica dos isolados em estudo	61
Tabela 10 – Actividade proteolítica apresentada pelas estirpes de <i>Staphylococcus</i> em estudo	63
Tabela 11 – Apresentação de resultados (%) da actividade proteolítica de estirpes de <i>Staphylococcus</i> de diferentes espécies, na Unidade Fabril A	65
Tabela 12 – Apresentação de resultados (%) da actividade proteolítica de estirpes de <i>Staphylococcus</i> de diferentes espécies, na Unidade Fabril B	65
Tabela 13 - Actividade lipolítica apresentada pelas estirpes de <i>Staphylococcus</i> em estudo	67
Tabela 14 – Avaliação da actividade lipolítica de estirpes de <i>Staphylococcus</i> , por espécie (%), na Unidade Fabril A	68
Tabela 15 – Apresentação de resultados (%) da actividade lipolítica, por espécie, na Unidade Fabril B.....	69
Tabela 16 - Actividade nitrato redutase apresentada pelas estirpes de <i>Staphylococcus</i> em estudo.....	70
Tabela 17 – Apresentação de resultados (%) da actividade nitrato redutase às diferentes temperaturas e por espécie, na Unidade Fabril A.....	72
Tabela 18– Avaliação da actividade nitrato redutase de estirpes de <i>Staphylococcus</i> em estudo da Unidade Fabril B às diferentes temperaturas e por espécie.....	73
Tabela 19 - Evolução da actividade proteolítica, lipolítica e nitrato redutase com diferentes valores de densidade óptica	73
Tabela 20- Efeito da temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio da estirpe de <i>Staphylococcus epidermidis</i> (P06-89).....	88

ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

b.p. – pares de bases

a_w – Actividade de água

DL – Decreto lei

DNA – ácido desoxiribonucleico

DO – Densidade óptica

Abs - Absorvância

Capítulo I: Introdução

Os produtos cárneos transformados apresentam uma grande variedade de sabores, texturas e formas como resultado da diversidade das matérias-primas, dos ingredientes e dos processos de fabrico utilizados.

Nos últimos anos, a indústria de salsicharia tem vindo a apresentar um apreciável incremento, expresso pelo elevado número de estabelecimentos fabris instalados e na variedade de produtos existentes. Alguns destes produtos poderão não apresentar as características dos produtos genuínos, apesar de subsistirem ainda, principalmente nos meios rurais, os chamados produtos tradicionais. Recentes mudanças sociais como as alterações dos hábitos dos consumidores, a diversificação da oferta, o crescimento da concorrência aliado ao aumento das expectativas e do nível de exigência dos consumidores, obriga a que o investimento em novas tecnologias seja um objectivo estratégico da maioria das empresas. Num sector tão competitivo é clara a importância que se deve dar ao conhecimento tecnológico e do mercado, bem como à mobilização de meios tecnológicos para aceder à informação relevante.

A fermentação da carne é um fenómeno biológico complexo acelerado pela acção desejável de certos microrganismos na presença de uma grande variedade de espécies que concorrem entre si ou agem em sinergia. As práticas tradicionais conduzem a uma grande variabilidade na qualidade dos produtos não sendo possível assegurar que o número e as espécies de microrganismos presentes no ambiente fabril e nas matérias-primas sejam sempre os mesmos e se comportem de forma semelhante. O isolamento e desenvolvimento de culturas *starters* a partir de flora residente “in house”, de produtos naturalmente fermentados podem evitar ou limitar a variabilidade na produção. Além disso, o desenvolvimento de culturas de arranque a partir de flora residente “in house”, pode permitir à indústria diversificar os produtos no mercado pois será capaz de produzir variedades de enchidos fermentados regionais com sabores específicos. O grande desafio é o desenvolvimento de culturas de arranque “in house” que melhorem a qualidade higiénica mantendo, ou mesmo melhorando, a qualidade sensorial.

Os *Staphylococcus* coagulase negativa têm um papel fundamental no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos produtos cárneos fermentados nomeadamente o aroma, sabor, textura e cor através da capacidade de redução dos nitratos e da sua actividade lipolítica e proteolítica.

Com este trabalho pretendeu-se (1) contribuir para a classificação genotípica da flora de *Staphylococcus* isolada de um produto cárneo (chouriço tradicional), ingredientes e ambiente fabril; (2) avaliar as capacidades tecnológicas em termos de actividade nitrato redutase, proteolítica e lipolítica das estirpes isoladas com vista à sua utilização como culturas *starter* (3)

avaliar a resistência das estirpes seleccionadas a diferentes condições de meio como pH, temperatura e concentração em cloreto de sódio.

A estrutura documental deste trabalho é composta por: Revisão bibliográfica onde é realizada uma análise crítica e meticulosa das publicações existentes no âmbito do trabalho proposto; Materiais e métodos onde são apresentadas as metodologias que permitirão não só identificar os isolados sob o ponto de vista fenotípico como genotípico mas também a sua caracterização tecnológica; apresentação dos resultados obtidos, sua discussão e conclusões, tendo como base publicações analisadas dentro do campo de aplicação deste trabalho concluindo-se sobre a adequabilidade das estirpes isoladas para serem utilizadas como culturas *starters* em enchidos fermentados e propostas de seguimento de trabalho futuro.

1.1. A origem dos enchidos – Perspectiva histórica

Desde os tempos primitivos que o Homem se alimentava de carne. O instinto vital do Homem primitivo obrigou-o a procurar os alimentos no meio em que vivia, conseguindo-o por recurso a práticas como a caça e o pastoreio.

O Homem paleolítico comia a carne crua das peças caçadas. Nessa época da humanidade desconhecia-se o fogo ea temperatura fria permitia a conservação da carne fresca, a qual sofria processos de fermentação tornando-a mais tenra e com melhor sabor.

Com a descoberta do fogo, a vida do Homem primitivo transformou-se. A conservação da carne era conseguida por meio de carbonização superficial ou por fumagem ou, até mesmo quando enterrada em cinza.

A carne era um alimento muito apreciado pelo Homem. Os gregos primitivos, heróis de Homero, ofereciam nos banquetes, entre outros alimentos, carne assada; já os primitivos espartanos distribuíam em banquetes públicos, a cada cidadão, uma ração de *physkai* (sopa negra) correspondente a uma mistura de carne de porco assada, vinho e pão de cevada, podendo este ser considerado como o primitivo antepassado da morcela tal como referenciado por Egaña (1948).

Na Grécia civilizada, os atenienses consumiam as mesmas carnes que actualmente figuram na nossa mesa e foram eles que se preocuparam em estabelecer diferenças entre as várias classes de carne, relacionando-as com a espécie e com a idade do animal. Na cultura romana encontram-se muitas notícias referentes ao consumo de carne das mais variadas espécies.

O sacrifício dos animais com a finalidade de obtenção de carne para alimentação do Homem remonta à pré-história. Enquanto, entre os egípcios e especialmente os judeus, se considerava a carne de porco impura, os romanos mostravam marcada predilecção por ela. Na antiga Roma os sacrifícios dos animais realizavam-se desde os anos 300 AC, ao ar livre e, mais tarde nos mercados que possuíam recintos especiais.

Foi a civilização romana a responsável pela organização do aprovisionamento, matadouro e comércio da carne. As indústrias cárneas eram bem conhecidas pelos Romanos tendo sido identificados vários tipos de enchidos que eram, por eles, consumidos. Ao longo dos anos os tipos de carne utilizados na alimentação pouco variaram tendo-se apenas alterado as práticas de abate e abastecimento, que passaram a ser alvo de regulamentação e os condimentos utilizados na preparação culinária ou na produção de transformados

1.2. Os enchidos em Portugal

Na Península Ibérica, as zonas do Norte de Portugal são um *habitat* natural do porco doméstico sendo comum a sua transformação em produtos fumados e enchidos, enquanto no sul de Portugal a zona de Barrancos e Serra de Monchique são algumas das zonas onde surgem boas condições para a sua criação.

A civilização mediterrânica inventou ou incorporou praticamente todos os condimentos e ervas nos alimentos; Os Lusitanos cultivaram esses condimentos nas suas hortas e jardins introduzindo também aqueles que surgiram durante a invasão árabe (VIII d.C.) e nas viagens que foram realizadas seguindo as rotas marítimas que os levaram à Índia e Ceilão (Anónimo, 2005).

Mas esse saber também veio frequentemente dos momentos dolorosos de fome e de grandes carências económicas. A fome foi muitas vezes a grande educadora que ensinou gerações e gerações a “tudo aproveitar” e a saber fazer, do nada, o suficiente para a sobrevivência da família. Foi uma acumulação de saberes em séculos e milénios de história os quais iam sendo aperfeiçoados por intuição, engenho e experiência.

As preocupações com a necessidade de conservação de alimentos levaram à criação de enchidos recorrendo a invólucros de tripa animal, que se enchem de carne picada, assim nasce um dos mais antigos alimentos processados criando-se um verdadeiro património cultural que deve ser preservado. São muitos os exemplos dos produtos de salsicharia divulgados e inscritos na cultura dos portugueses, que, através dos tempos adquiriram notoriedade.

Aquilo que inicialmente era uma actividade essencialmente caseira industrializou-se e, na primeira metade do século XX, acompanhando a revolução industrial no nosso país, surgiram as primeiras indústrias de salsicharia. Hoje, existem muitas pequenas e médias empresas que produzem a mais variada gama de produtos de salsicharia que, pela sua diversidade, origens, características organolépticas e saber fazer baseado na tradição, são cada vez mais um alimento presente na mesa dos portugueses. (Fraqueza, 2008).

Presentemente uma aposta destas empresas é o desenvolvimento de novos produtos e novos sabores de forma a ir ao encontro das necessidades e expectativas dos clientes cada vez mais exigentes com a qualidade dos produtos que adquirem.

1.3. Enchidos fermentados secos

Os enchidos fermentados secos são preparados a partir de carne temperada a qual é colocada em invólucros próprios e deixada a fermentar e a maturar representando uma significativa parte dos produtos tradicionais de carne (Lucke, 1998).

Os enchidos fermentados secos, fabricados principalmente com carne de porco e / ou carne magra e gordura de porco, representam uma significativa parte dos produtos tradicionais de carne.

De acordo com Hui *et al.* (2004), citado por Ockerman & Basu (2007), os enchidos fermentados são produtos de carne cortada ou picada que devido à acção das bactérias atinge um pH de 5,3 ou menos. A secagem retira-lhes 20 a 50% de água, resultando num produto em que a relação água /proteína se situa entre 1,0 e 2,3.

Demeyer (2004) refere que os produtos fermentados são aqueles cujas propriedades específicas (pH, aw) são principalmente devidas ao efeito do metabolismo bacteriano.

Pode-se assim considerar que os enchidos fermentados secos são aqueles em que a cor, o aroma, o sabor e outras características organolépticas se produzem de uma forma natural a partir da própria carne e gordura. À excepção da desidratação que é um fenómeno puramente físico, todos os outros fenómenos como por exemplo a coloração da carne, a acidificação e a hidrólise proteica, realizam-se com a colaboração da flora microbiana específica.

Na Europa, os enchidos fermentados têm naturalmente uma longa tradição de fabrico originada dos países mediterrânicos durante os tempos romanos (Comi *et al.*, 2005). A produção espalhou-se em seguida à Alemanha, Hungria e outros países, incluindo os Estados Unidos, Argentina e Austrália (Demeyer, 2004). A Europa é, ainda hoje o maior produtor e consumidor de enchidos fermentados secos.

Existe uma grande variedade de produtos secos fermentados no mercado europeu, como consequência de variações nas matérias-primas, ingredientes, formulações e processos de fabrico, que vêm de hábitos e costumes dos diferentes países e regiões. Todavia, os produtos do Norte têm um produto com pH inferior a 5, enquanto os produtos mediterrânicos têm um pH de 5,3-6,2 e são desidratados. Em ambas as categorias de enchidos, o desenvolvimento industrial preconizou o uso de culturas de arranque para padronizar e controlar o seu fabrico. Salienta-se que o fabrico artesanal de enchidos levemente fermentados formam um grupo de produtos tradicionais do Mediterrâneo com uma grande diversidade regional quer dentro de cada país quer entre eles (Talon, Leroy, Lebert, 2007).

O enchido tradicional pode ainda ser definido como um produto feito de uma mistura de carne (geralmente de porco), gordura em proporção variável e sal, incluindo, eventualmente, açúcar, nitratos e / ou nitrito (Fontana, Cocconcelli & Vignolo, 2005). A fermentação e cura / secagem nem sempre constituem duas etapas separadas e podem ser realizadas num secador natural, de acordo com as condições climáticas locais (Morot Bizot, Leroy & Talon, 2006). Os enchidos tradicionais dependem da contaminação natural com microflora ambiental, a qual ocorre durante o abate dos animais e aumenta durante a sua fabricação. (Talon *et al.*, 2007).

A produção tradicional, na Europa, pode ser classificada em duas categorias principais. A primeira centra-se na produção artesanal em que a matéria-prima carne é proveniente de animais criados na exploração (em algumas regiões, utilizando os animais criados localmente). Neste caso, a carne processada, quer na exploração quer em unidades de produção colectiva (cooperativas), bem como os produtos resultantes são vendidos directamente pelo agricultor. Este sistema encontra-se bem desenvolvido em França, Alemanha, Bélgica e Reino Unido estando presente também na Itália, Eslováquia e Norte de Portugal (Talon *et al.*, 2007a).

A segunda centra-se na produção através de unidades de processamento locais que podem ou não ser propriedade de um açougueiro, que fabricam produtos tradicionais a partir de carne com origem em diferentes explorações e matadouros. Em Portugal, Espanha, e Itália, a matéria-prima carne pode ser proveniente do matadouro local. Os produtos são vendidos directamente pela unidade, no mercado local ou fornecidos a restaurantes. Esta forma de produção é desenvolvida no sul da França, Espanha, Itália, Portugal e Alemanha (Talon *et al.*, 2007a).

1.4. Classificação dos enchidos fermentados

Ao longo dos anos os enchidos têm sido classificados de diversas formas e as classificações oficiais variam de país para país. As diversas classificações podem basear-se em diferentes propriedades como o conteúdo em água, conteúdo em proteína, quociente água/proteína, etc..

Por exemplo, a legislação espanhola classifica-os em: frescos, crus-marinados, crus-curados, tratados pelo calor, carnes salgadas, pratos preparados cárneos e outos derivados cárneos.

A classificação francesa estabelece vários grupos que se diferenciam entre si pelas características das matérias-primas que integram o produto final: formados por peças salgadas, por misturas de carnes picadas, à base de carne e subprodutos e, nestas categorias estabelecem-se diferentes classes de acordo com o tratamento tecnológico aplicado (Flores, 1977). Já na legislação húngara os produtos cárneos são classificados em 5 grupos atendendo ao tipo de matérias-primas utilizadas, prazo de validade, tratamento mecânico a que são submetidos e processo tecnológico (Fornias & Diaz, 1990).

Não obstante as várias classificações existentes, estes autores consideram que a classificação dos produtos cárneos deve ter por base a aplicação ou não de tratamento térmico. Lucke (1998, citado por Juarez, 2005) propõe uma classificação de um ponto de vista microbiológico que se baseia na actividade de água (a_w) e no tratamento de superfície (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação dos enchidos baseada no valor de a_w (adaptado de Lucke, 1998 citado por Juarez, 2005)

Categoria	Tempo de cura	a_w final	Aplicação de fumo
Enchidos secos com bolores	>4 semanas	< 0,90	Não
Enchidos secos com bolores	>4 semanas	< 0,90	Sim (durante a fermentação)
Enchidos secos sem crescimento de bolores	>4 semanas	< 0,90	Sim ou não
Enchidos semi secos com bolores	< 4 semanas	0,90 – 0,95	Não
Enchidos semi secos sem crescimento de bolores	<4 semanas (10 a 20 dias)	0,90 – 0,95	Sim (com exceções)
Enchidos fermentados frescos, para untar	< 2 semanas	0,94-0,96	Sim ou Não

1.4.1 – Enchidos fermentados portugueses

Em Portugal, as regiões onde mais predominantemente são fabricados os enchidos são o Norte de Portugal (nomeadamente Trás-os-Montes), Ribatejo e Alentejo aparecendo algum fabrico na região de Monchique (Fraqueza, 2003). Em cada uma das regiões mencionadas é enorme a diversidade de produtos desenvolvidos.

As Normas Portuguesas NP 589:2008 e NP 4451:2008 definem chouriço de carne e chouriço respectivamente como o enchido fumado e/ou curado constituído por carne de suíno e gordura rija de suíno, em fragmentos macroscopicamente visíveis, adicionados de condimentos, aditivos e/ou outros ingredientes facultativos. Estão excluídos na presente definição, os enchidos que resultem de processos tecnológicos de conservação baseados na diminuição do valor de pH.

O chouriço de carne classifica-se em chouriço de carne tradicional, extra e corrente.

De acordo com a Norma NP 591:1969, salpicão é o enchido volumoso, curado pelo fumo, constituído exclusivamente por carnes e gorduras de porco, frescas ou tratadas pelo frio, pouco fragmentadas, adicionadas de certos condimentos e aditivos totalmente autorizados.

Três dos produtos tradicionais mais apreciados são o chouriço tradicional alentejano, o salpicão e chouriça de vinhais (Ferreira *et al.*, 2007)

O chouriço tradicional alentejano é um produto que é frequentemente fabricado e composto na sua massa por um rácio de carne/gordura de 70/30 ou nalguns casos de 80/20 (Elias, Fraqueza & Barreto, 2006). O sal e as massas de alho e pimentão são ingredientes sempre usados. Misturas comerciais contendo nitratos, nitritos, fosfatos e ascorbatos podem também ser utilizados. A fumagem é um processo a que recorrem a generalidade das unidades tradicionais, sem qualquer controlo de temperatura e de humidade. O período de cura efectuado pode variar entre os dois e os quarenta e dois dias.

Os enchidos tradicionais de Trás-os-montes – “Salpicão de Vinhais” e “Chouriça de Vinhais”, feitos de carne e gordura de porco Bísaro (uma raça autóctone do Norte de Portugal), fazem parte da dieta diária da região de Vinhais (Ferreira *et al.*, 2007). Ambos os produtos são feitos de carne de porco marinada numa mistura de sal, água, vinho da região e especiarias. Na produção da “Chouriça” são utilizados “pequenos pedaços de carne e gordura, enquanto na produção do Salpicão são utilizados pedaços de carne magra do lombo de maiores dimensões. Após um período de 48 h a 4 °C, ocorre o enchimento da mistura de carne em tripa natural de porco sendo o produto resultante fumado durante 3-4 semanas. Apesar das temperaturas de fumagem não serem na maioria dos casos controladas, elas situam-se entre os 20-30°C, normalmente estes produtos são consumidos sem cozimento adicional.

1.5. Fabrico dos enchidos; factores que condicionam o seu fabrico

1.5.1. Matérias-primas

1.5.1.1. Carne

O Regulamento 853/2004 de 29 de Abril define carne como “ as partes comestíveis dos animais ungulados domésticos, aves de capoeira, lagomorfos, caça selvagem e caça miúda e grossa selvagem incluindo o sangue. Regra geral, a carne de animais adultos tem vantagens devido ao seu alto conteúdo em mioglobina, o que contribui para uma cor mais intensa (Lucke, 1998).

Na opinião de Pezacki (1979, citado por Elias, Fraqueza & Barreto, 2006) as carnes utilizadas na produção de enchidos devem ser firmes, com elevado poder tampão e boa capacidade de retenção de água e com valores de pH entre 5,4 e 6,0.

A carne possui na sua constituição: água, proteínas, lípidos (gordura), glucogénio, sais minerais e substâncias nitrogenadas não proteicas.

A água, que existe na carne numa proporção de 75 a 80%, encontra-se maioritariamente no interior da célula. Uma fracção mais desprezível ocupa os espaços extra celulares, solubilizando os sais minerais. Cerca de metade do conteúdo em água encontra-se ligada a grupos proteicos, estando a sua estabilidade condicionada ao valor do pH. Uma alteração no valor de pH tornando o meio ácido, modifica e diminui a capacidade de retenção de água da carne, enquanto se o seu pH for elevado apresenta maior capacidade de retenção (Warriss, & Brown, 1987). As proteínas musculares estão representadas principalmente pela miosina e actina, contudo a mioglobina é uma proteína que tem um papel fundamental na coloração do músculo. A cor característica do produto curado pode derivar da concentração dos pigmentos heme (mioglobina, hemoglobina) ou do seu estado químico e de aditivos, como os óxidos de azoto e agentes redutores (Gøtterup *et al.*, 2007).

As proteínas procedentes do sarcolema, que se encontram associadas aos ácidos polinucleicos, têm um papel importante no processo de maturação da carne.

A quantidade de lípidos depende do teor de gordura com tecido adiposo e pode variar de 1-13% do músculo total (Toldrá, 2007). Os lípidos podem ser encontrados intramuscularmente, intermuscular ou à volta do tecido adiposo. A composição dos lípidos sobretudo triglicéridos e fosfolípidos, varia com a sua localização. Assim, os lípidos intramusculares são principalmente constituídos por triglicéridos, os quais são armazenados nas células de gordura, e por fosfolípidos que fazem parte das membranas celulares. Os lípidos intermusculares e o tecido adiposo são principalmente constituídos por triglicéridos com uma pequena quantidade de colesterol.

O conteúdo e tipo de ácidos gordos na carne varia com a alimentação, modo de produção (intensiva, semi extensiva ou extensiva), sexo, raça e idade dos animais.

A composição em triglicéridos da carne e gordura é muito importante pois através dela conhecemos as características do processo produtivo e o tipo de produto que dela pode resultar. Por exemplo, se a gordura é rica em ácidos gordos polinsaturados como o ácido linoleico será muito suave e com tendência para a oxidação (aroma a ranço e cor amarelo escuro) (Morgan *et al.*, 1992 citado por Toldrá, 2007)

A gordura tem um papel importante no fabrico dos enchidos fermentados secos pois é ela que, não só impede a desidratação intensa da carne, conservando os enchidos tenros e com suco, como também mantém a humidade da fibra muscular, facilitando as fermentações úteis à cura (Janeiro, 1948)

Os fosfolípidos apesar de presentes em pequena quantidade têm um papel importante no desenvolvimento do aroma e na oxidação dado que são relativamente ricos em ácidos gordos polinsaturados.

A carne é pobre em hidratos de carbono podendo ser constituída por polissacáridos como o glicogénio, açúcar mais relevante com um papel importante na maturação da carne, colaborando na descida do pH juntamente com outros compostos de decomposição do ATP e monossacáridos (glicose e frutose).

1.5.1.2. A gordura

A gordura deve ser firme com um alto ponto de fusão e um baixo conteúdo de ácidos gordos polinsaturados uma vez que estes estão na base dos processos de oxidação lipídica (Frey 1985 citado por Elias *et al.*, 2006).

1.5.1.3. Outras matérias-primas não cárneas

Várias matérias-primas não cárneas podem ser usadas destacando-se o sangue que é usado em quantidades tais que permitam reforçar a cor dos produtos.

O fígado, rim, pulmões, coração, devido ao seu alto conteúdo em proteína, também podem ser usados em proporções que variam consoante o tipo de enchido.

1.5.1.4. Água e outros excipientes

A água não possui nenhuma propriedade tecnológica no fabrico dos enchidos fermentados secos constituindo apenas um meio de difusão dos condimentos ou temperos e tornando-os facilmente absorvíveis pela carne e permitindo também uma melhor homogeneização da massa (Ruiz, 2007).

A adição de vinho aos enchidos tem já uma longa tradição e tem como objectivo, entre outros, conferir ao produto um aroma e gosto específicos, favorecer a coloração através dos radicais SH presentes, permitir uma maior difusão dos compostos aromáticos presentes nas especiarias e favorecer a maturação da carne através do tanino presente.

Regra geral é adicionado vinho branco de forma a não mascarar a cor própria do enchido (Visier, 1980).

1.5.1.5. Principais ingredientes

1.5.1.5.1 Sal

O sal tem sido, desde o início dos tempos, um dos ingredientes utilizado na condimentação dos enchidos. Por outro lado a salga foi um dos primeiros métodos de conservação da carne.

O sal para além de conferir sabor, reduz a actividade da água e consequentemente o controlo dos microrganismos de degradação quando utilizado em elevadas concentrações, enquanto em concentrações mais baixas aumenta a capacidade de retenção de água, facilita a solubilização das proteínas e reduz a actividade de algumas enzimas (Ruiz, 2007).

O sal alimentar, tal como definido no DL 350/2007, é o produto cristalino de extracção no estado natural (tal qual) ou tratado, essencialmente constituído por cloreto de sódio, num mínimo de 90 % do produto seco.

A Portaria 72/2008 refere que o sal alimentar tal qual compreende, quanto à sua proveniência, os seguintes tipos e subtipos: sal marinho (obtido da evaporação da água do mar, pela acção do calor do sol e da energia do vento, em salinas com traçado tradicional e colheita manual do sal, ou obtido da evaporação da água do mar, pela acção do calor do sol e da energia do vento, em salinas com outro traçado e com extracção do sal dos cristalizadores utilizando meios mecânicos, em grau diverso); sal de fontes salinas (obtido da evaporação de águas salinas subterrâneas, pela acção do calor solar e da energia do vento, em cristalizadores de traçado tradicional e com recolha manual do sal), sal-gema (extraído por dissolução controlada e posteriormente recristalizado por evaporação da solução salina pela acção do calor solar e da energia do vento, em cristalizadores com traçados e meios de extracção diversos ou por outras formas de energia ou directamente extraído pelo processo de lavra subterrânea convencional de jazigos minerais).

Ainda de acordo com a mesma Portaria, o sal alimentar tal qual destinado ao consumo directo na alimentação humana é aquele que provém exclusivamente de salinas de traçado tradicional com as características e condições de produção descritas no mesmo.

A solução saturada de cloreto de sódio (superior a 26,5 g/100 g de solução) tem uma actividade de água (a_w) de 0,753 pelo que a adição de solução salina à carne provoca uma diminuição da actividade da água na fase de maturação. A quantidade de sal adicionado nos enchidos fermentados é normalmente inferior a 4% (p/v), que apesar de provocar uma redução ligeira na actividade de água é fundamental para a estabilização da massa, contribuindo para a selecção da população microbiana e consequente diminuição de pH (Ruiz, 2007).

Goutefongen (1991, citado por Elias, *et al.*, 2006) refere que, para concentrações superiores a 10% de cloreto de sódio, o crescimento da maior parte das formas bacterianas halossensíveis é inibido, enquanto concentrações de 5% inibem apenas formas anaeróbias. Elias *et al.* (2007) referem que a adição de sal tem um carácter prejudicial sobre a fracção lipídica, na medida em que acelera a ocorrência de fenómenos de auto oxidação.

A quantidade de sal pode estar relacionada com o crescimento dos microrganismos, em especial os *Staphylococcus* e, consequentemente com a produção de compostos aromáticos. Tjener, Stanke, Andersen & Martinussen, 2004 salientaram que o sal tem um efeito negativo na acidificação, provavelmente devido à inibição das bactérias lácticas. No entanto, foi constatado não haver uma correlação directa entre o sal e o pH. O sal tem um efeito negativo ao nível dos compostos voláteis indicando o seu efeito inibitório sobre uma parte daqueles compostos. Os níveis de metil aldeídos ramificados estão contudo correlacionados positivamente com o sal. Um efeito similar foi verificado por Olesen, Meyer & Stanke, (2004) e foi levantada a hipótese de que, uma vez que o sal inibe as bactérias lácticas e consequentemente a acidificação do meio, os *Staphylococcus*, mais tolerantes ao sal, teriam vantagem na menor acidificação do meio e aumento da degradação de aminoácidos.

A actividade de certos enzimas microbianos envolvidos na formação do aroma dos enchidos fermentados pode ser afectado pela concentração de cloreto de sódio. Toldra, Flores & Sanz, 1997 mostraram que concentrações de cloreto de sódio de 25 a 60g/litro activa as propriedades lipolíticas enquanto outros autores reportaram que altas concentrações de cloreto de sódio podiam inibir a actividade lipolítica mostrando que, quando o conteúdo em cloreto de sódio diminuía, a libertação de ácidos gordos aumentava (Stahnke, 1995, citado por Ruiz, 2007). Por outro lado, a actividade proteolítica parece também ser inibida pelo elevado nível de sal (Toldra, 1992, citado por Ruiz, 2007).

A solubilidade das proteínas miofibrilares está directamente relacionada com a força iónica da solução. A presença de cloreto de sódio aumenta a força iónica e, consequentemente a solubilização das proteínas, melhorando as propriedades gelificantes e emulsionantes das proteínas da carne, o que é particularmente importante para a obtenção de um produto com as características de textura desejáveis.

A solubilização da miosina é satisfatória para conteúdos em cloreto de sódio de 2% e óptima para conteúdos iniciais de cloreto de sódio de 4% o que, no entanto, leva à obtenção de produtos com um sabor “salgado” (Durand, 1999 citado por Ruiz, 2007).

Gardini *et al.*, 2004 (citado por Ruiz, 2007) observaram uma reduzida produção de amins biogénicas em enchidos com um alto (5%) valor de sal, devido às baixas contagens de microrganismos.

1.5.1.5.2. Sais de cura

Dentro desta categoria inclui-se o nitrato e nitrito de potássio e o nitrato de sódio. Estes sais têm uma grande solubilidade na água permitindo-lhes penetrar rapidamente na carne.

No sal comum, estes sais inorgânicos, principalmente o nitrato, estão muitas vezes presentes como impurezas.

A adição do nitrito no início do processo de maturação é importante uma vez que nesta fase do processo características como o baixo potencial redox, a baixa actividade água e o baixo pH ainda não foram estabelecidas.

O efeito do nitrito tem sido estudado nos produtos curados e pode ser sumariado como: contribuir para o desenvolvimento da cor (formação da cor vermelha característica), inibição de bactérias patogénicas como o *Clostridium botulinum* e *Salmonella*, contribuição para o desenvolvimento do *flavour* típico da carne curada, e a inibição dos processos de oxidação prevenindo assim o aparecimento do ranço (Verluyten, Messens & Vuyst, 2003).

Por outro lado, o nitrato é necessário nos processos de cura longa para actuar como fonte de nitrito pela acção das enzimas nitrato redutase presentes nos *Staphylococcus*. O uso de nitratos é interessante uma vez que, comparativamente com o nitrito, incrementa a produção de *flavour* (Marco, Navarro & Flores, 2006).

A formação da cor e a sua estabilidade estão entre as características de qualidade mais críticas dos produtos de carne processada e, portanto, de grande importância para a indústria da carne. Nos produtos fermentados tradicionais, a cor encarnada característica é resultante da reacção química entre compostos derivados do nitrato/nitrito adicionado e a mioglobina que ocorre naturalmente, levando à formação simultânea do nitrosomioglobina, cor vermelho brilhante (MbFeII^{NO}), em que existe uma ligação do óxido nítrico (NO) ao ião ferro (Fe) central do Heme. Sabe-se no entanto que a estabilidade deste pigmento não é assegurada para longos períodos de armazenagem principalmente se existirem condições prooxidantes (Gotterup *et al.*, 2007).

À luz da legislação, os nitritos e nitratos de sódio e de potássio são conservantes autorizados em produtos à base de carne, uma vez que os nitritos contribuem para a segurança microbiológica, bem como para o aroma, cor e estabilidade anti-oxidante desses produtos. Assim, o DL 33/2008 de 25 de Fevereiro estabelece um teor máximo de 150 mg/kg de nitrito de potássio e nitrato de sódio e de 300 mg/kg de nitrato de potássio adicionado para os produtos à base de carne não tratados termicamente, no intuito de manter o teor de nitrosaminas o mais baixo possível, reduzindo o teor de nitritos e nitratos adicionados aos alimentos mas continuando a manter a segurança microbiológica dos produtos alimentares.

1.5.1.5.3. Açúcares

O papel dos açúcares na formulação dos enchidos fermentados é o de substrato para o desenvolvimento das bactérias lácticas e correspondente produção de ácido láctico podendo nalguns tipos de enchidos ser também adicionado com o objectivo de lhe conferir um sabor doce combatendo o gosto acre de algumas substâncias (Visier, 1980). A descida no valor de pH pode ser mais ou menos pronunciado relacionando-se com o tipo e a quantidade de açúcar adicionado. A glucose é mais facilmente assimilada pelos microrganismos, no entanto podem ser utilizados outros açúcares como a lactose, sacarose ou outros açúcares como o amido ou a dextrina com a finalidade de regular a velocidade de acidificação (Lucke, 1998).

1.5.1.5.4. Acidificantes

A maior parte dos enchidos fermentados secos tem um pH entre 4,5 e 5,5 assegurando assim a inibição de agentes patogénicos e microrganismos não patogénicos indesejáveis, a gelificação e emulsificação das proteínas, a formação dos pigmentos de cura, a promoção da proteólise e lipólise envolvida na maturação da carne para além de lhe conferir um sabor acre, ou seja, a acidificação permite acelerar todo o processo de cura e a obtenção de um produto com qualidade e segurança.

Apesar de na prática se dar naturalmente uma descida do valor de pH, conseguida pela fermentação dos açúcares pelas bactérias do ácido láctico naturalmente presentes no produto, ou adicionadas e, de forma a promover uma rápida descida de pH no início da fase de maturação, as formulações tradicionais, em especial as que não contêm culturas de arranque, preveem a adição de ácidos orgânicos principalmente ácido láctico ou citrítico (Rust, 2007).

1.5.1.5.5. Especiarias

As especiarias são partes de plantas aromáticas, fraccionadas ou reduzidas a pó que contêm um alto conteúdo em óleos essenciais, razão pela qual são altamente aromáticas e quando adicionadas aos alimentos conferem-lhes aroma e sabor específicos.

A adição de especiarias aos enchidos permite, para além de lhes proporcionar aroma e sabor, mascarar/desodorizar aromas indesejáveis e conferir textura ao produto final.

Quanto menores forem as partículas das especiarias, maior será a sua acção (Rosário, 1989 citado por Elias *et al.*, 2007)

Cada especiaria tem o (s) seu (s) componente (s) principal (is) o qual existe no respectivo óleo essencial e/ou na oleoresina. Os óleos essenciais são constituídos por hidrocarbonetos aromáticos, alifáticos e cíclicos e alguns derivados oxigenados e sulfurados (Gerhardt, 1975 e Garcia e Bejarano, 2001 citado por Elias *et al.*, 2007). As especiarias determinam um aumento da actividade glandular, com maior produção de saliva e suco gástrico o que melhora a digestibilidade dos alimentos.

Algumas especiarias possuem efeitos antioxidantes possivelmente devido à sua actividade quelante de metais, inibindo o aparecimento da fase inicial do auto oxidação. Têm capacidades de hidratação e de emulsão e propriedades farmacológicas e cuja eficácia depende dos meios aos quais são adicionadas (Gerhardt, 1975, Zaika e Kissinger, 1981, Farag *et al.*, 1989, Garcia e Bejarano, 2001, citado por Elias *et al.*, 2007).

São também conhecidas as propriedades antibacterianas das especiarias o que pode explicar a estabilidade demonstrada pelos enchidos com especiarias, desde que devidamente embalados e armazenados.

Cerca de 50 diferentes tipos de especiarias são usados na indústria alimentar das quais cerca de 25 a 35 são usadas nos produtos processados de carne (Charalambous, 1994, Farrel, 1990, Hirasa e Takemasa, 1998, Lewis, 1984, Tainter e Grenis 2001, Uhl 2000, Under-rinder e Hume 1994, citados por Suey-Ping Chi e Yun-Chu Wu, 2007).

Os condimentos mais utilizados no fabrico de enchidos tradicionais alentejanos são o alho ou a massa de alho, e a massa de pimentão (Elias *et al.*, 2007).

O alho é uma planta fortemente aromática cujo principal princípio activo é a alicina (di-propenilo tiosulfonato), responsável pela maioria das propriedades farmacológicas da planta. A alicina é um líquido de coloração amarelada que só aparece quando o alho é mastigado ou cortado, rompendo-se as células do bulbo sendo também responsável pelo forte odor característico da planta. A alicina possui actividade antimicrobiana sobre as bactérias Gram negativas e Gram positivas (Ankri & Mirelman, 1999). Segundo O’Gara, Hill & Maslin (2000) o óleo de alho evidenciou ser, consistentemente mais potente do que o pó de alho quando testado *in vitro*. O alho inibe diferencialmente as bactérias sendo as do ácido láctico as menos sensíveis e podendo mesmo estimular o seu crescimento pelo facto de providenciar uma fonte de carboidratos (Verluyten *et al.*, , 2004).

Contém ainda uma certa quantidade de açúcares o que dificulta o seu uso em produtos carneos. Uma vez que se trata de um bulbo poderá apresentar perigos microbiológicos próprios dos produtos cuja parte subterrânea está em contacto com a terra contudo a probabilidade de ocorrência de desenvolvimento é baixa face ao carácter bactericida/bacteriostático do seu princípio activo. O alho pode ser apresentado sob a forma de alho desidratado, macerado de alho em solução alcoólica ou sobre a forma de óleos essenciais obtidos por destilação da planta fresca (Visier, 1980).

Tanto o pimentão como a paprika são pós obtidos a partir de várias espécies de pimentos, os quais conferem ao produto uma coloração vermelho-alaranjada (capsanteno, capsorrubeno, betacaroteno, zeaxanteno, etc.) acentuada e um sabor e aroma característico. O pimentão apresenta propriedades antioxidantes (Verluyten *et al.*, 2004).

A paprika é um pimento com origem na Húngria que pode apresentar-se em três diferentes qualidades: a normal com sabor menos pronunciado, a rosada com sabor mais doce e de aroma agradável e a picante.

1.5.1.6. Outros ingredientes

Outros produtos podem ser adicionados às massas com o objectivo de as tornar numa massa homogênea (polifosfatos), de prevenir a ocorrência de oxidação (α tocoférol) os quais não irão aqui ser detalhados. O ácido ascórbico ou o ascorbato de sódio podem também ser adicionados à massa com o objectivo de diminuir a quantidade de nitrito residual uma vez que favorece a sua transformação em óxido nítrico o que contribui para a formação e estabilidade da cor do produto final (Gotterup *et al.*, 2007).

1.5.1.7. Invólucros

Na produção de enchidos artesanais são normalmente utilizados invólucros naturais nomeadamente as tripas (intestino delgado e grosso), as serosas peritoniais, o estômago e as bexigas. Em processos mais industrializados são também utilizados invólucros artificiais fabricados a partir de colagénio, de celulose, de pergaminho ou de fibras membranosas ou ainda a combinação das duas primeiras (Fraqueza, 1992). Destes materiais o mais utilizado é o colagénio reconstituído por possuir características semelhantes à tripa natural (Ockerman e Hansen 1996, Fernandez, 2000 citado por Elias *et al.*, 2007).

As tripas naturais (intestino) têm as características de resistência, elasticidade e permeabilidade necessárias no processo de fabrico de enchidos fermentados secos, elas tornam-se menos permeáveis após os processos de secagem e de fumagem. A humidade e o calor fazem as tripas mais porosas e mais macias razão pela qual se deve controlar cuidadosamente a etapa de fumagem e a humidade relativa (Yun-Chu & Ping Chi, 2007).

Uma adequada selecção da tripa é muito importante para a obtenção de um produto de qualidade.

1.5.1.8 Culturas de arranque (starters)

Os enchidos fermentados são o resultado de uma conjugação de alterações bioquímicas, físicas, sensoriais e sobretudo microbiológicas, que ocorrem numa mistura de carne, gordura e outros ingredientes durante a fase de cura em condições definidas de temperatura e de humidade relativa. Apesar de, nos nossos dias, alguns dos enchidos serem produzidos industrialmente com recurso a culturas de arranque ainda há muitas regiões da Europa onde estes produtos são obtidos através de tecnologias tradicionais sem adição de cultura de arranque. Neste último caso, os microrganismos fermentadores necessários são originários da própria carne ou do meio ambiente fabril e constituem a denominada "flora de casa" que influencia o aroma, textura, propriedades nutricionais e a segurança dos produtos (Bonomo, Ricciardi, Zotta, Sico & Saltano, 2009).

A identificação e selecção de bactérias para uso como culturas de arranque iniciou-se na segunda metade do século 20. Em 1940, Jensen e Paddock (citado por Cocconcelli, 2007) desenvolveram a ideia de inocular a matéria-prima dos enchidos fermentados com *Lactobacillus* com o objectivo de acelerar a maturação da carne. Nos anos 50, na Europa e nos Estados Unidos foram desenvolvidas culturas de *Micrococcus* spp e *Pediococcus cerevisiae* (Niinivaara, 1995 citado por Cocconcelli, 2007). A combinação destas experiências levou Nurmi (1996, citado por Cocconcelli, 2007) a desenvolver a primeira cultura mista composta por *Lactobacillus* e *Micrococcus*.

As culturas de arranque são preparações que contêm formas viáveis (vivas ou inactivas) de microrganismos que se desenvolvem no substrato de fermentação e com uma actividade metabólica desejada. Regra geral, mas não necessariamente, os microrganismos crescem e multiplicam-se neste substrato (Hammes, 1995 citado por Hammes & Hertel, 1998). A sua qualidade deve ser considerada sob aspectos microbiológicos, tecnológicos e sensoriais do seu desempenho na matriz carne.

Hammes (1995, citado por Hammes & Hertel, 1998) forneceu argumentos relativamente aos aspectos que devem ser incluídos na definição da qualidade microbiológica destas preparações: i) Conhecida identidade dos microrganismos ao nível taxonómico; ii) Estabilidade das propriedades fisiológicas desejadas, iii) Pureza biológica (ausência de contaminação que interfira com as propriedades desejáveis da preparação); iv) Segurança higiénica (livre de qualquer contaminação que interfira com a saúde do consumidor). As espécies identificadas mais utilizadas como culturas de arranque foram: *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. sakei*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Kocuria varians*, *Streptomyces griseus*, *Bifidobacterium spec.*, *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* subsp. *carnosus*, *S. carnosus* subsp. *utilis*, *S. equorum*,

Halomonadaceae: Halomonas elongata; Enterobacteria: *Aeromonas* spec.; Fungi: *Penicillium nalgiovense*, *P. chrysogenum*, *P. camemberti*; Yeasis: *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata* (Hammes e Knauf, 1994, citado por Hammes & Hertel, 1998). Pequenas alterações têm ocorrido nomeadamente no campo da investigação sistemática em bacteriologia o que levou a mudanças na sua posição taxonómica, bem como da nomenclatura, por exemplo o *Lactobacillus sake* mudou de nomenclatura para *L. sakei* (Truper e De Clari, 1997).

As culturas de arranque comercializadas na Europa, são produzidas principalmente nos países do Norte, adaptando-se mal e competindo com a microflora colonizada nas fábricas do Sul da Europa portanto, a sua utilização resulta muitas vezes na perda das desejáveis características sensoriais (Casaburi *et al.*, 2007). Por esta razão, os enchidos fermentados tradicionais são, muitas vezes de qualidade superior, em comparação com aqueles que são inoculados com culturas de arranque possuindo qualidade distinta, devido à tecnologia utilizada e às propriedades da carne crua (Moretti *et al.*, 2004, Casaburi *et al.*, 2007). Não é possível assegurar de que o nº e as estirpes presentes nas matérias-primas sejam sempre as mesmas e se comportem de igual forma, pelo que os starters devem ser seleccionados a partir de microrganismos indígenas os quais estão bem adaptados ao ambiente fabril e à carne e são mais competitivos devido às suas capacidades metabólicas (Leroy, Verhuyten & De Vuyst, 2006).

Para que as culturas de arranque sejam adequadas, deve também ser tido em consideração a formulação específica da massa e a tecnologia de fermentação, uma vez que os factores ambientais irão interagir para seleccionar um número limitado de estirpes que competem para dominar o processo (Rebecchi, Crivori, Sarra & Cocconcelli, 1998). Os factores ambientais que possivelmente afectam a selecção das estirpes são as condições de maturação, tais como temperatura, humidade relativa, pH, cloreto de sódio, carne crua e outros ingredientes. A fim de formar a cultura de arranque ideal de qualquer tecnologia em particular e da receita, é necessário entender as propriedades necessárias, e ter ferramentas para melhorar as propriedades da cultura (Hansen, 2002).

Os *Staphylococcus* coagulase negativa e as bactérias do ácido láctico são os mais importantes microrganismos utilizados como *starters* nos enchidos fermentados. Muitos autores sugerem que os *Staphylococcus*, têm um papel fundamental, em detrimento das bactérias do ácido láctico, no desenvolvimento das propriedades sensoriais pela redução dos nitratos e actividade lipolítica e proteolítica (Mauriello, Casaburi, Blaiotta & Villani, 2004; Olesen *et al.*, 2004).

Actualmente, a utilização de culturas de arranque é um pré-requisito da indústria da carne, de forma a assegurar a reprodutibilidade do produto, redução dos tempos de fermentação e valorização das características organolépticas.

Os métodos analíticos clássicos baseados nas características bioquímicas e fisiológicas têm sido usados para seleccionar as estirpes com melhor desempenho para uso tecnológico.

Foram baseados principalmente na capacidade de acidificação e propriedades antimicrobianas para bactérias produtoras de ácido e na evolução da cor e sabor para os *Staphylococcus* (Talon *et al.*, 2007). Em alguns estudos a actividade nitrato redutase é o primeiro critério na selecção de estirpes para utilização como *starters* (Garcia-Varona, Santos & Rovira, 2000). Durante a última década, estudos genéticos têm fornecido conhecimentos básicos sobre estas actividades metabólicas. Recentemente foram desenvolvidos métodos de sequenciação do genoma completo das bactérias o que permitirá uma melhor compreensão da sua fisiologia em termos do ecossistema carne. Morot-Bizot *et al.* (2006) ao estudarem 201 estirpes de *Staphylococcus equorum* constataram a existência, entre eles, de 8 distintos genótipos o que evidencia uma grande diversidade entre a espécie, tendo concluído que o genótipo dominante existia tanto no produto acabado como no ambiente fabril, o que indica que algumas estirpes se podem adaptar às diferentes condições e sobreviver.

Hammes & Hertel (1998) estudaram a forma de otimizar os parâmetros de uma cultura de arranque mista de forma a proporcionar alta viabilidade por um período de tempo longo. Estes autores verificaram que a eficiência da cultura de arranque bacteriana para a fermentação de produtos de carne depende, em primeiro lugar, das estirpes seleccionadas, dos respectivos rácios e co-existência de uma cultura mista. Para melhorar a qualidade e o sabor dos produtos de carne fermentados é muito importante aumentar a razão da concentração da proporção de *Micrococcus* para *Lactobacillus* de 3:1. Os parâmetros do inóculo nomeadamente concentração, proporção entre estirpes e o tipo de estirpes são essenciais para a qualidade dos produtos de carne fermentado seca e para a reprodutibilidade da tecnologia de produção da cultura de arranque bacteriana.

1.5.2. Processo de fabrico

A tecnologia de fabrico do chouriço engloba, na generalidade, seis etapas: selecção da carne e da gordura, miga, preparação da massa, maturação da massa, enchimento e cura (Liepe, 1985, Muguerza *et al.*, 2004, Ruusunen & Poulanne, 2004, citado por Elias *et al.*, 2006).

O processo de fabrico inicia-se com a limpeza da carne de partes da mesma que não conferem ao enchido as características desejadas.

As carnes e a gordura são depois cortadas em fragmentos cujo tamanho depende do tipo de enchido a fabricar. O corte pode ser manual com o auxílio de facas sendo executado em cima de mesas, ou mecanicamente.

O grau de redução de tamanho está directamente relacionado com a eliminação da água, mais lenta nos fragmentos de maior dimensão, e com a ligação das massas, maior com fragmentos de menor dimensão (Elias *et al.*, 2006).

A carne e a gordura depois de cortadas são colocadas em recipientes apropriados onde são adicionados os sais de cura, aditivos e outros ingredientes e as culturas de arranque se aplicável. A adição dos ingredientes deve ser realizada para que se consiga uma mistura homogénea entre a massa e os produtos adicionados.

A massa é então misturada/homogeneizada podendo esta operação ser manual ou mecânica, em máquinas misturadoras, após o que é submetida a um repouso durante o qual se realiza o fenómeno da maturação, e o qual depende do tipo de origem do enchido.

A fase de maturação é caracterizada essencialmente pela entrada e difusão do sal nos fragmentos de carne e solubilização e extracção das proteínas miofibrilhares e pelo desenvolvimento da população microbiana com a libertação de produtos do seu metabolismo. As proteínas miofibrilhares quando extraídas tornam viscosas as superfícies dos fragmentos da carne e desempenham um papel fundamental na ligação das massas (Elias *et al.*, 2006).

Após o período de maturação segue-se o enchimento das massas o qual pode ser feito manualmente ou através de máquinas de enchimento assegurando-se que a tripa se encontra totalmente preenchida. O enchido é depois atado e picado com uma agulha ou pico de modo a permitir a saída de ar e água indesejáveis.

A cura é a última fase e a mais importante na preparação dos enchidos podendo ser obtida por processos de fumagem ou simples secagem ao ar ambiente.

Nos nossos dias, os processos de cura são essencialmente processos de cura rápida permitindo assim à indústria reduzir os custos associados a um processo de cura longa. Contudo, a cura rápida resulta na perda das características típicas no produto final, especialmente as relacionadas com o aroma e o sabor.

Os processos de cura são diferentes nas diferentes regiões da Europa. No Norte da Europa são curtos, usando apenas nitrito como agente de cura, juntamente com a fumagem dos produtos. No Mediterrâneo são usados tempos de cura maiores, envolvendo tanto o nitrato como o nitrito e sem processos de fumagem (Marco *et al.*, 2006). A fumagem consiste na colocação dos enchidos à acção do fumo resultante da combustão da madeira de azinho, faia, entre outras em fumeiros, câmaras ou até mesmo à lareira.

O fumo actua sobre os enchidos através da sua composição (acção antiséptica) e da sua temperatura (por desidratação). É bem conhecido o intenso poder fungistático dos componentes do fumo.

A duração e a temperatura da fumagem varia com o tipo de enchido existindo uma relação entre a natureza e a dimensão do enchido e a intensidade do fumo (Fraqueza, 2003).

No caso dos enchidos como o chouriço tradicional português, a fumagem deve realizar-se a frio (temperatura inferiores a 25°C) prolongando-se assim a fase de maturação.

O fumo é composto por vários produtos entre eles a creosota, ácido pirolenhoso, o ácido acético, o aldeído fórmico, os quais possuem um poderoso efeito antiséptico e conferem à massa um sabor ligeiramente amargo característico.

A duração de aplicação de fumo deve ser apenas a suficiente para que a creosota e o ácido pirolenhoso penetrem na massa do enchido. É o fumo que confere ao enchido a cor amarela dourada de intensidade variável de acordo com a duração da fumagem.

A fumagem produz como que uma curtimento dos enchidos que os protege das causas de alteração e garante a sua boa conservação e a qual se traduz pela formação, à superfície dos produtos fumados, de uma camada de albuminóides coagulados, imputrescível, que impede a penetração dos microrganismos no seu interior (Janeiro, 1948).

A cura pelo ar consiste na colocação dos enchidos em secadinhos, nos quais é imperioso manter um equilíbrio perfeito entre temperatura, humidade e ventilação, assegurando-se um equilíbrio entre evaporação superficial e desidratação interna. A temperatura ótima varia entre 12 e 16°C e a humidade entre 85 e 90% Hr (Janeiro, 1948). Quando a desidratação é muito rápida devido a uma ventilação excessiva nota-se o endurecimento precoce do enchido e o aparecimento de rugas pronunciadas. Se pelo contrário a desidratação for muito lenta, fruto de uma ventilação fraca, nota-se uma flacidez dos enchidos.

1.6. Família das *Micrococcaceae*

A presença ou ausência de catalase e citocromo permite separar os cocos Gram positivo em dois grupos. A família das *Micrococcaceae* (*Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Planococcus*), *Deinococcaceae* e membros do género *Stomatococcus* possuem catalase ou citocromos ou ambos enquanto os outros géneros não têm esta composição ou exibem fraca catalase mas não contêm citocromo.

A família das *Micrococcaceae* engloba bactérias esféricas com 0,5 a 2,5 µm de diâmetro, Gram positivo, não móveis ou móveis com menor frequência, aeróbios ou anaeróbios facultativos com metabolismo respiratório e/ou fermentativo. Estas bactérias utilizam aminoácidos ou carboidratos como carbono e fonte de energia. Todas as colónias crescem na presença de 5% cloreto de sódio e algumas com valores de cloreto de sódio entre 10 e 15%. Algumas espécies são patogénicos oportunistas dos animais ou do Homem.

O género *Micrococcus* compreende todas as bactérias que possuem um teor molar Guanina (G) e Citosina (C) > 55 %, podendo ser distinguidos claramente dos outros cocos gram positivo através da composição da parede celular no que se refere ao conteúdo em bases de nucleótidos G+C e padrão de menaquinona (Vit K₂) Schleifer (1986).

A composição da parede celular e o baixo teor molar (C+G) caracterizam o género *Staphylococcus* (30 – 39 mol%).

1.6.1. Caracterização dos *Staphylococcus* coagulase negativa

1.6.1.1. Generalidades

Os *Staphylococcus* foram isolados pela primeira vez em 1978 por Robert Koch. Em 1880, Alexander Ogston, médico escocês, adoptou a sua designação da palavra grega *staphylo* (cacho de uvas). Em 1884, Rosenbach identificou duas espécies que designou de “*aureus*” e “*albus*” devido à coloração observada.

O género *Staphylococcus* compreende microrganismos com células esféricas, 0,5 a 1,5 µm de diâmetro que ocorrem simples ou aos pares e em grupos irregulares. Gram positivos, não móveis, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos. As colónias são geralmente opacas, podendo ser brancas, creme, amarelas ou laranja.

A célula contém peptidoglicanos e ácido teicoico. Os carboidratos e/ou os aminoácidos são utilizados como fonte de carbono e fonte de energia.

Com excepção do *S. saccharolyticus* que é anaeróbio, todas as restantes espécies crescem de uma forma mais rápida e abundante sob condições aeróbias. Usualmente catalase positiva e oxidase negativa. Muitas das espécies crescem na presença de 10% de cloreto de sódio e entre 18 e 40°C com uma temperatura óptima entre 30° e 37°C.

Estão associados não só com a pele e mucosas de vertebrados de sangue quente mas também com os produtos alimentares, pó e água.

Segundo Euzéby (2003) existem 41 espécies de *Staphylococcus* e 21 subespécies.

As metodologias que hoje existem para classificar géneros, espécies e subespécies de microrganismos são duas: genotípicos e fenotípicos.

Os métodos fenotípicos representam uma identificação através de características bioquímicas, fisiológicas e biológicas enquanto através dos métodos genotípicos é possível avaliar pequenas alterações a nível molecular.

Os perfis bioquímicos nem sempre são adequados para identificar inequivocamente alguns *Staphylococcus* para além de que o uso de substratos altera a cor devido à actividade destes microrganismos introduzindo um aspecto subjectivo da avaliação (Quere, Deschamps & Urdaci, 1997, citado por Iacumin, Comi, Cantoni, Cocolin, 2006).

1.6.1.2. *Staphylococcus carnosus*

A espécie *Staphylococcus carnosus*, cuja nomenclatura foi proposta em 1982, tinha sido inicialmente identificada como *S. simulans*. Schleifer & Fischer (1982) demonstraram claramente que o *S. simulans* e *S. carnosus* pertenciam a duas espécies diferentes.

Trabalhos efectuados sobre 18 estirpes de *Staphylococcus carnosus* isolados de enchidos ou de peixes fermentados (Probst *et al.*, 1998, citado por Euzéby, 2003) classificaram o *S. carnosus* em três grupos (A, B e F). Este último apresentava características fenotípicas particulares tendo sido renomeado de *S. condimentii*. As estirpes do grupo A e B apresentam uma similaridade superior a 70% pelo que foram consideradas num só grupo. No entanto tendo em conta as suas características fenotípicas e genotípicas as estirpes foram repartidas em duas subespécies: *S. carnosus* subespécie *carnosus* (grupo A) e *S. carnosus* subespécie *utilis* (Grupo B) (Euzéby, 2003).

Para além das características comuns ao género *Staphylococcus*, os *S. carnosus* são cocos de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, formando colónias de 1 a 3 mm de diâmetro usualmente cinzento claros, reduzem os nitratos a nitritos (à excepção de uma estirpe da subespécie *utilis*) e estes a amónia. Existe produção de ácido a partir da glucose (em meio aeróbio ou anaeróbio) e a partir da frutose, manose, manitol e glicerol (em anaerobiose). Muitas estirpes produzem ácido a partir da trealose e outras produzem ácido a partir da lactose e galactose mas quando na presença de arabinose, rafinose, sucrose, maltose, xilose, xilitol, ribose e turanose não o produzem.

Todas as estirpes crescem bem entre 15 e 45°C (ótimo 30-40°C) mas não há desenvolvimento a 8°C. Suportam uma concentração de cloreto de sódio superior a 15%. O *Staphylococcus carnosus* apenas foi isolado dos géneros alimentícios transformados pelo Homem e o seu habitat natural é desconhecido.

Esta espécie distingue-se dos outros *Staphylococcus* principalmente pela sua capacidade de produzir acetoina, crescer em meios com 15% de cloreto de sódio, reduzir o nitrato a nitrito e não ter a capacidade de produção de ácido a partir da maltose, lactose e sucrose (Schleifer & Fischer, 1982).

1.6.1.3. *Staphylococcus simulans*

Os *Staphylococcus simulans* são cocos de 0,8 a 1,5 µm de diâmetro formando colónias de 5 a 7,5 mm de diâmetro usualmente cinzento claro (não pigmentadas). O seu crescimento é bom em concentrações de cloreto de sódio acima de 10% mas fraco a 15%. A maior parte das estirpes cresce entre 15 e 45°C (temperatura ótima 25-40°C).

As bactérias desta espécie têm capacidade de produção de ácido a partir da glucose, manitol em particular (em meio aeróbio ou anaeróbio) e a partir da frutose, sucrose e glicerol (em anaerobiose). Muitas das estirpes produzem ácido a partir da lactose, manose e trealose.

Esta espécie fermenta o manitol o qual parece ser um produto intracelular do metabolismo da glucose. Produzem elevados níveis de manitol intracelular comparativamente às outras espécies (à excepção do *S. xylosus*) (Schleifer, 1986)

A maior parte das estirpes reduz nitrato a nitrito e são produtoras de lípases e estearases mas não hidrolisam a caseína ou gelatina (Schleifer, 1986)

1.6.1.4. *Staphylococcus equorum*

A nomenclatura do *S. equorum* foi proposta inicialmente por Schleifer *et al.*, (1984; citado por Euzéby, 2003).

São conhecidas duas subespécies do *S. equorum*: subespécie *equorum* e subespécie *linens*. Estes cocos de 0,8 a 1,5 µm de diâmetro formam colónias, após 48 h de incubação, de 1 a 6 mm de diâmetro usualmente brancas, opacas e por vezes hemolíticas. A temperatura óptima de crescimento é da ordem dos 30 – 32°C não tendo sido evidenciado crescimento a temperaturas de 42°C.

As bactérias desta espécie reduzem os nitratos e produzem ácido a partir da frutose, D-glucose e D-manose. A subespécie *equorum* fermenta o manitol enquanto a subespécie *linens* não o fermenta (Euzéby, 2003).

Tendo como base apenas as características bioquímicas é difícil distinguir entre *S. equorum* sub espécie *equorum* e *S. xylosus* o que só é conseguido através do recurso a técnicas de biologia molecular (Euzéby, 2003).

1.6.1.5. *Staphylococcus saprophyticus*

Os *Staphylococcus saprophyticus* são cocos de 0,8 a 1,2 µm de diâmetro formando colónias de 4 a 9 mm de diâmetro com pigmentação variável: muitas estirpes não possuem pigmento ou possuem um pigmento ligeiramente amarelado o qual aumenta de intensidade com a idade. São conhecidas duas subespécies do *S. saprophyticus*: subespécie *saprophyticus* e subespécie *bovis*.

O crescimento destas estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* é fraco a 10°C não sendo evidenciado o seu crescimento a 45°C (temperatura óptima 28°C a 35°C). As bactérias desenvolvem-se em concentrações de cloreto de sódio de cerca de 10% em agar mas o seu desenvolvimento é fraco numa concentração de 12,5%. Estas bactérias produzem ácido a partir da frutose, glucose, glicerol, maltose, manitol, ribose, trealose e N-acetilglicosamina sob condições aeróbias e a partir da glucose em condições anaeróbicas. O manitol produzido intracelularmente advém do metabolismo da glucose (Schleifer, 1986)

A maior parte das estirpes estudadas por Schleifer & Kloos (1975) produziam pequenas quantidades de ácido láctico (principalmente L- ácido láctico). A esculina e o amido não são, regra geral, hidrolisados pela subespécie *bovis* (Hajek *et al.*, 1996).

Muitas das estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* não reduzem o nitrato mas a subespécie *bovis* tem essa capacidade (Hajek *et al.*, 1996).

A diferença entre a subespécie *bovis* e *saprophyticus* reside no tamanho da colónia, capacidade de redução do nitrato e capacidade de produção de pirrolidonil arilamidase mas não acetilmetilcarbinol e fermentação da galactose e ribose. As propriedades úteis para a identificação e separação da subespécie *bovis* de outras espécies e subespécies (por ex: *S. equorum*, *S. xylosus*, subespécie *saprophyticus*) são o tamanho da célula, redução de nitratos, produção de urease e ácido a partir da ribose e a sua incapacidade para hidrolisar esculina, e produção de ácido a partir da celobiose, rafinose e xilose (Hajek *et al.*, 1996).

1.6.1.6. *Staphylococcus epidermidis*

Os *Staphylococcus epidermidis* caracterizam-se por serem cocos de 0,5 a 1,0 µm de diâmetro, formando colónias de 2,5 a 4,0 mm de diâmetro usualmente cinzento ou cinzento claros (não pigmentadas) raramente com um pigmento amarelo claro ou acastanhado (Schleifer & Kloos, 1975). Apresenta um tipo respiratório de anaeróbios facultativos crescendo melhor em condições de aerobiose. O seu crescimento é bom em meios até 7,5% de cloreto de sódio. Mais de 80% das estirpes estudadas por Schleifer *et al.* (1975) tiveram um fraco crescimento a concentrações de cloreto de sódio de 10%, não tendo sido evidenciado crescimento a 15%. Todas as estirpes cresciam a 45°C mas a 15°C cresciam pouco ou não cresciam; mais de 80% das estirpes reduzia o nitrato.

Todas as estirpes estudadas produziram ácido, em aerobiose, a partir da glucose, frutose, maltose, sucrose e glicerol (Schleifer *et al.*, 1975) enquanto 70% a 90% das estirpes produziam ácido a partir da galactose, manose, lactose ou turanose e menos de vinte por cento produziam ácido a partir da ribose ou melezitose. Todas as estirpes produziam predominantemente ácido láctico (L-ácido láctico) e apenas cerca de 10% D- ácido láctico.

O *S. epidermidis* não fermenta o manitol mas apresentam a capacidade de produzir protéases, lípases, fosfolípases, lípases lipoproteínas, estearases e desoxiribonucleases (Baird Parker 1963, citado por Schleifer (1986).

1.6.1.7. *Staphylococcus xylosus*

Os *Staphylococcus xylosus* são cocos de 0,8 a 1,2 µm de diâmetro formando colónias de 5 a 10 mm de diâmetro com coloração variável. Muitas das estirpes estudadas apresentaram colónias com uma coloração laranja amarelada ou amarelo acinzentado. Algumas estirpes não produziam pigmento a 35 – 37°C mas desenvolviam uma coloração intensa a temperaturas inferiores a 20°C. Aproximadamente 20% das estirpes estudadas não exibiam pigmentação em qualquer das temperaturas estudadas de 15° a 45°C (Schleifer & Kloos, 1975).

Todas as estirpes desta espécie crescem bem em meios com concentrações acima de 10% de cloreto de sódio. À concentração de 15% de cloreto de sódio cerca de 48% das estirpes estudadas crescem pouco e 14% não crescem. Todas as estirpes crescem bem a 15°C mas 62% não evidenciam crescimento a 45°C (Schleifer & Kloos, 1975).

A fermentação da glucose origina produção de L-lactato, contudo em pequenas quantidades. Algumas estirpes de *S. xylosus* produzem altos níveis de manitol intracelular comparado com outras espécies (Schleifer, 1986)

É produzido ácido por estas bactérias a partir de vários carboidratos como por exemplo: glucose, frutose, manose, xylose, manitol, sucrose e glicerol. Algumas, mas raras estirpes, podem não produzir ácido a partir da sucrose, maltose ou manitol. Cerca de 80% das estirpes produzem ácido a partir da galactose, arabinose, lactose, trealose ou turanose.

Cerca de 80% das estirpes têm capacidade de reduzir os nitratos. Cerca de 40 a 70% das estirpes evidencia actividade das lipases mas muitas das estirpes não apresentam actividade proteolítica (Schleifer, 1986)

1.7. Provas de interesse tecnológico

1.7.1. Actividade nitrato redutase

O nitrato é adicionado aos enchidos fermentados mais pela capacidade de fixar e obter a cor típica dos produtos curados do que pelas suas propriedades antimicrobianas. Para ser eficaz o nitrato precisa de ser reduzido a nitrito. Os *Staphylococcus* possuem essa actividade nitrato redutase a qual é importante para a formação da nitrosomioglobina, composto responsável pela coloração vermelha escura dos enchidos fermentados. Esta actividade foi detectada nas

espécies *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. lentus* e *S. simulans*. Para outras espécies como *S. saprophyticus*, *S. succinus* e *S. warneri*, a actividade nitrato redutase, foi raramente encontrada (Mauriello *et al.*, 2004).

Através da actividade nitrato redutase dá-se a produção de nitrito o qual pode limitar a oxidação lipídica por três mecanismos indirectos que podem operar simultaneamente: i) ligação ao grupo heme e prevenção da libertação do ferro catalítico; ii) ligação ao grupo não heme ferro inibindo catalase; iii) e/ou estabilizando os lípidos oleofinicos contra a oxidação. (Talon, Walter, Chartier, Barriere, Montel, 1999).

A síntese da actividade nitrato redutase depende da estirpe, da presença de nitrato e da interacção entre estes dois factores (Talon *et al.*, 1999) sendo influenciada pelas condições de incubação.

Casaburi, Blaiotta, Mauriello, Olimpia & Villani (2005) constataram que a redução de nitrato a nitrito estava dependente da temperatura. Os mesmos autores reportaram que as estirpes de *Staphylococcus* (*S. carnosus* e *S. simulans*) isoladas quer pelo método de agar a 30°C quer pelo método espectrofotométrico possuíam actividade nitrato redutase confirmando o anteriormente relatado por Mauriello *et al.*, (2004), que verificaram que todas as estirpes de *S. xylosus*, *S. equorum* e *S. lentus* tinham capacidade de reduzir os nitratos a nitritos. Também Miralles, Flores & Perez-Martinez, (1996) evidenciaram a capacidade nitrato redutase de estirpes de *S. xylosus* e de *S. epidermidis*.

A actividade nitrato redutase é crucial para a formação de nitrosomioglobina (MBFeII NO) em produtos cárneos com nitritos adicionados como único agente de cura sendo também importante na formação da nitrosomioglobina com nitrito adicionado independentemente da capacidade das estirpes expressarem actividade nitrato redutase (Gotterup *et al.*, 2007).

1.7.2. Actividade lipolítica e proteolítica

Uma das razões pela qual os *Staphylococcus* coagulase negativo são considerados microrganismos importantes nos enchidos fermentados é exactamente pela sua capacidade de libertar enzimas, lipases e proteases, capazes de formar compostos de baixo peso molecular como péptidos, aminoácidos, aldeídos, amins e ácidos gordos de cadeia curta que influenciam a textura e o desenvolvimento dos compostos responsáveis pelo aroma (Mauriello *et al.* 2004).

As lipases são enzimas que actuam sobre os lípidos catalisando a reacção química que estas moléculas podem sofrer. A lipólise tem sido atribuída parcialmente aos membros do género *Staphylococcus* e parcialmente às lipases endógenas sendo estas últimas mais importantes na formação do aroma (Montel, Reitz, Talon, Berdagué & Rousset, 1996). A libertação dos ácidos

gordos como resultado das lipases endógenas e exógenas é o substrato para as reacções bioquímicas que levam à formação dos compostos responsáveis pelo aroma (Casaburi *et al.*, 2007).

As proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. As proteinases dividem-se em endopeptidases e exopeptidases de acordo com a posição da ligação peptídica a ser cindida na cadeia peptídica. Assim, as endopeptidases actuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica entre as regiões N e C terminal enquanto as exopeptidases actuam somente no final das cadeias polipeptídicas na região N e C terminal. Aquelas que actuam na região amino terminal livre libertam um único resíduo de aminoácido e são designadas aminopeptidases. As exopeptidases que actuam na região carboxi terminal livre e libertam um único aminoácido são designadas carboxipeptidases. A proteólise nos enchidos tem sido atribuída principalmente às enzimas endógenas ou exógenas originadas pelos microrganismos sendo influenciada por algumas variáveis como a formulação do produto, condições de processo e o *starter* utilizado (Hughes *et al.*, 2002). Apesar das enzimas indógenas serem as principais responsáveis pela degradação das proteínas, as peptídases e proteases bacterianas contribuem de modo significativo para a degradação inicial das proteínas e a consequente libertação dos aminoácidos (Martin, Colin, Aranda, Benito, Cordoba, 2007).

A maior actividade enzimática tem lugar nas fases de maturação e de cura. Alguns autores reportaram uma maior libertação de aminoácidos livres no início do processo ou seja no início da maturação a qual foi atribuída às mais altas temperaturas aplicadas nesta etapa comparada com as baixas temperaturas aplicadas na secagem (Diaz, Fernandez, Garcia de Fernando, Hoz & Ordonez., 1997).

De acordo com Bonomo *et al.*, (2009) as espécies de *Staphylococcus* mais proteolíticas eram o *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. succinus*, *S. saprophyticus* e *S. pulveneri*.

1.8. Formação de Nitrosaminas por acção microbiana

As nitrosaminas são compostos orgânicos, potencialmente carcinogénicos para o Homem, que podem ocorrer nos alimentos como produto de reacção entre aminas secundárias e agentes nitrosantes. De entre as nitrosaminas, as voláteis são as consideradas mais cancerígenas. A formação endógena de nitrosaminas é decorrente da reacção entre um agente nitrosante e amidas, aminas ou alquilureias, geralmente favorecida com um pH óptimo entre 2 e 4, dependendo do substrato (Dutra, Rath & Reyes, 2007).

As nitrosaminas podem estar presentes em alimentos conservados pela adição de nitrato e/ou nitrito ou fumados (o óxido de nitrogénio presente no fumo interage com o oxigénio formando

tetróxido de nitrogénio (N_2O_4) o qual actua como agente nitrosante (Tricker, Preussmann, 1991). O nitrito é convertido em ácido nitroso o qual é um dos principais precursores do agente nitrosante em alimentos o qual reage com aminas e aminoácidos da carne formando nitrosaminas. Os microrganismos também podem participar na formação de nitrosaminas reduzindo o nitrato a nitrito ou degradando as proteínas em aminas e aminoácidos (Tricker, Preussmann, 1991). A concentração de compostos N-nitrosos depende de factores como: método de cozedura, temperatura e tempo de fumagem, concentração do nitrito residual ou adicionado, concentração de precursores de nitrosaminas, humidade e, condições e métodos de processamento (Miller, Billdeau, Miller, 1989).

À temperatura ambiente e, estando presentes aminas secundárias e nitrito nos alimentos a reacção de nitrosilação é lenta sendo apenas concluída para aminas que sejam bases fracas (Foremann & Goodhead, 1975). A formação de N-nitrosaminas nos alimentos pode ser controlada através da monitorização da adição de nitrito uma vez que a velocidade de formação das N-nitrosaminas é directamente proporcional ao quadrado da concentração desse ião (Shuker, 1968). A incorporação de ácido ascórbico no fabrico dos produtos fermentados permite eliminar ou reduzir significativamente os níveis de N-nitrosaminas uma vez que ele reage rapidamente com o nitrito formando ácido deidroascórbico e óxido nítrico, o qual não é um agente nitrosante.

A histamina faz parte de um grupo de substâncias denominadas aminas biogénicas, as quais desempenham um papel importante no metabolismo celular podendo no entanto ter efeitos tóxicos quando presentes nos alimentos em concentrações elevadas ou quando a actividade das enzimas que metabolizam estas substâncias no Homem for deficiente por problemas genéticos ou inibida por agentes farmacológicos.

As aminas biogénicas classificam-se em três grupos: aminas aromáticas (histamina, tiramina, serotonina, triptamina e β -feniletilamina), diaminas alifáticas (putrescina e cadaverina) e poliaminas alifáticas (agmatina, espermina e espermidina).

Os produtos cárneos fermentados são um dos tipos de alimentos com probabilidade de se poder encontrar quantidades apreciáveis de aminas biogénicas nomeadamente tiramina, putrescina, cadaverina e histamina (Latorre-Moratalla *et al.*, 2010). A tiramina e a putrescina foram as aminas que registaram maior concentração na “Chouriça de vinhais” e a tiramina no “Salpicão de vinhais” (Ferreira *et al.*, 2007). A tiramina tem sido reportada como a amina mais abundante nos produtos cárneos fermentados (Ferreira *et al.*, 2007a). As aminas biogénicas podem ser formadas por microrganismos que possuem actividade aminoácido-descarboxilase, sejam estes adicionados intencionalmente (starter) ou não (microrganismos contaminantes).

Os pré-requisitos necessários para a formação de aminas biogénicas nos alimentos estão assegurados pela disponibilidade de aminoácidos livres, pela presença de microrganismos

descarboxilase positivos e por condicionantes que permitam o crescimento microbiano e a síntese e actividade da descarboxilase.

A eventual descarboxilação dos aminoácidos pelos microrganismos pode resultar em altas quantidades de aminas biogénicas tóxicas. As aminas biogénicas estão normalmente presentes nos produtos fermentados secos uma vez que as condições produtivas favorecem as reacções de descarboxilase causadas pelos microrganismos amino positivos quando a temperatura está entre 20 a 30°C, pH entre 5 e 7 e as bactérias descarboxilantes possam existir em grandes quantidades pelo que, os microrganismos fermentativos devem ter descarboxilase negativos (Erkkila *et al.*, 2001).

Capítulo 2: Materiais e Métodos

2.1. Origem dos isolados em estudo

O trabalho experimental foi realizado em 107 isolados retirados do ambiente fabril, de massa de enchido tradicional fermentado e fumado (chouriço) e de ingredientes secundários (alho, massa de pimentão e tripa) de duas indústrias de salsicharia tradicional (A e B) situadas no Alentejo. Os isolados foram previamente identificados através de testes bioquímicos por Fraqueza *et al.* (2006).

2.2. Colheita das amostras e isolamento de *Staphylococcus spp*

A colheita das amostras e a implementação dos métodos analíticos para controlo microbiológico tiveram por base os requisitos da *International Organization for Standardisation* (ISO) e uma harmonização conjunta entre os grupos de trabalho participantes no projecto Tradisausage (Tradisausage, 2006)

De cada unidade de fabrico foram colhidas amostras de superfícies de trabalho, de acordo com os requisitos da Norma ISO 18593:2004: (i) picadora; (ii) enchedora; (iii) mesa; (iv) caixa; (v) faca; (vi) parede da camara de refrigeração.

As colheitas foram efectuadas após realização dos procedimentos de limpeza e desinfecção das superfícies, seguidas habitualmente por cada fabricante. Foram amostradas 500 cm² em cada local de colheita, usando compressas estéreis humedecidas com uma solução neutralizante (Humeau, La Chapelle-sur-Erdre, França), que foram posteriormente transferidas para 25 ml de solução de água peptonada tamponada estéril (BPW, AES Laboratory) e homogeneizadas no *Stomacher*.

Adicionalmente, foram também efectuadas colheitas de amostras de massa de chouriço em três fases diferentes de fabrico (massa de produto após enchimento, massa após fermentação, massa de produto final) e de ingredientes secundários (alho, massa de pimentão e tripa). Após preparação das amostras de acordo com a ISO foram efectuadas contagens de *Staphylococcus* coagulase negativos em meio manitol salt agar (Scharlau, Espanha) após um período de incubação a 37°C durante 48 horas retirando-se colónias características (amarelas ou rosa) que foram isoladas em triptona soja agar (TSA, Scharlau, Espanha) e caracterizadas bioquimicamente por APIStaph (Biomerieux, França).

2.3. Conservação de isolados

Os isolados em estudo foram conservados em criotubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI, Scharlau, Espanha) com glicerol 1,5% (Merck, Alemanha) a -80°C.

2.4. Cultivo para revivificação

Cada um dos criotubos com o isolado seleccionado foi descongelado à temperatura ambiente após o que foram semeadas duas pérolas de inóculo em caldo Brain Heart Infusion (BH, Scharlau, Espanha) a 37°C durante 24 a 48 horas em aerobiose.

2.5. Caracterização fenotípica dos isolados

A partir de cultura em BHI efectuou-se a sementeira dos isolados em placas Manitol Salt Agar (MSA, Scharlau, Espanha) com gema de ovo (Oxoid, Inglaterra) seguindo-se incubação a 37°C durante 24 - 48 horas em aerobiose.

Das colónias obtidas foram efectuadas as seguintes provas:

2.5.1. Observação visual da morfologia das colónias

Foi observada a conformação das colónias e seu tamanho. Verificou-se a coloração do meio uma vez que o mesmo adquire uma coloração amarela na presença de bactérias capazes de fermentar o manitol. Foi observada e registada a morfologia das colónias.

2.5.2. Prova da Catalase

Através desta prova determina-se a capacidade dos microrganismos produzirem a enzima catalase para degradar o peróxido de hidrogénio obtendo-se água e oxigénio.

Assim, foi colocada uma colónia retirada do meio MSA numa lâmina à qual se adicionou umas gotas de reagente catalase (ID-ASE, Biomerieux, França).

Se a bactéria possuir a enzima catalase (catalase positiva) ocorre o desdobramento do peróxido de hidrogénio com libertação imediata de oxigénio cuja visualização se traduz em formação de bolhas de ar; a ausência deste borbulhar é uma prova negativa.

2.5.3. Prova da Oxidase

Esta prova permite distinguir grupos de microrganismos tendo como base a actividade da enzima citocromo oxidase.

A citocromo oxidase catalisa a oxidação de um citocromo pelo oxigénio molecular com formação de água. A capacidade das bactérias produzirem esta enzima foi determinado pela adição do reagente da oxidase (Biomerieux, França).

Embebeu-se uma folha de papel de filtro em reagente oxidase e, com o auxílio de uma ansa, picou-se uma colónia colocando-a em contacto com o reagente. O desenvolvimento de coloração rosa a violeta escuro na superfície do papel é indicativo da produção de citocromo oxidase e representa uma prova positiva. Se não houver alteração da cor ou, se a superfície do papel de filtro apresentar uma coloração rosa ligeira é indicativo da ausência da actividade oxidase sendo considerada uma prova negativa.

2.5.4. Observação microscópica de esfregaços de colónias bacterianas: coloração de Gram

A coloração de Gram aplicada a esfregaços de colónias bacterianas é uma técnica de coloração diferencial que permite distinguir os dois principais grupos de bactérias por microscopia óptica classificando-as em Gram positivas (cor violeta escuro) e Gram negativas (cor rosa-vermelha). A técnica de coloração de Gram consiste em expor as células bacterianas à seguinte sequência: violeta de cristal (corante primário, Scharlau, Espanha), solução de iodo (mordente, Scharlau, Espanha); álcool (agente descolorante, Scharlau, Espanha) e fucsina (agente contrastante, Scharlau, Espanha). Para a observação utilizou-se um microscópio (Olympus, Inglaterra) com objectiva de imersão e ampliação 1000 x.

2.5.5. Critérios de selecção de estirpes

A redução do manitol não foi considerada um critério de selecção uma vez que, dentro das espécies em estudo temos as que fermentam e as que não fermentam o manitol. Assim foram considerados os isolados manitol positivos (fermentação do manitol com passagem do meio, de vermelho para amarelo), isolados com fermentação lenta (coloração alaranjada) e isolados que não reduzem o manitol (coloração vermelha). Quanto ao tamanho da colónia o mesmo foi considerado apenas como um elemento comparativo.

Os critérios de selecção a ter em conta foram a catalase, oxidase e coloração gram tendo apenas sido seleccionados os isolados em estudo com provas catalase positiva, oxidase negativa e cocos gram + (positivo).

2.6. Identificação genotípica

2.6.1. Cultura de isolados em estudo

Uma vez seleccionados os isolados retirou-se com o auxílio de uma ansa uma unidade formadora de colónias e procedeu-se a sementeira de superfície em meio TSA (Tryptic soy agar, Scharlau, Espanha). Seguiu-se a sua incubação a 37°C durante 24-48h.

O meio de cultura TSA é um meio não selectivo onde crescem diversas bactérias. É um meio rico em peptona, fonte de carboidratos, proteínas e lípidos propícios ao desenvolvimento dos microrganismos. Através dele pretende-se obter cultura fresca para se proceder, de seguida, à extracção do DNA genómico.

2.6.2. Extracção do DNA genómico

Para a extracção de DNA das estirpes seleccionadas foi utilizado o Kit “QIAamp DNA mini kit 02/2003” da Quiagen, Alemanha.

Retirou-se a partir de cultura em meio TSA uma ansa de bactérias e suspendeu-se em 180 µl de tampão ATL num Eppendorf de 1,5 ml. Após agitação adicionou-se 20 µl de Proteinase K, misturou-se e incubou-se a 56°C durante cerca de 3 horas. Obteve-se assim a lise das células bacterianas.

Seguiu-se a adição de 200 µl de tampão AL na amostra procedendo-se após mistura a uma incubação a 70°C durante 10 minutos. Após esta fase, pipetou-se 200 µl de etanol e homogeneizou-se.

A amostra foi transferida do tubo Eppendorf para uma das colunas QIAamp Spin Column. Efectuou-se uma centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto. Colocou-se o QIAamp Spin Column num novo Eppendorf de 1,5 ml, rejeitando-se o filtrado obtido.

Na QIAamp Spin Column juntou-se 500 µl de Buffer AW1 e procedeu-se a uma centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto. Colocou-se o QIAamp Spin Column num novo Eppendorf de 1,5 ml com rejeição do filtrado obtido. Seguiu-se a adição de 500 µl de Buffer AW2, na QIAamp Spin Column. Procedeu-se a uma centrifugação a 13200 rpm durante 4 minutos. Colocou-se o QIAamp Spin Column num novo Eppendorf de 1,5 ml. Rejeitou-se o filtrado.

Seguiu-se a adição de 200 µl de tampão AE com incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos e, centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto. Retirou-se a coluna do Eppendorf. O extracto obtido foi armazenado a 4°C, se para utilização imediata, caso contrário a conservação é efectuada a -22°C.

2.6.3. Quantificação e avaliação da pureza de DNA genómico total por espectrofotometria UV

Os extractos de DNA foram mantidos a baixas temperaturas por colocação em gelo móido. Utilizou-se tampão TE (Tris-EDTA) numa célula de quartzo para efectuar o zero da leitura do espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Inglaterra) seguindo-se a leitura das amostras de DNA extraídas. Efectuou-se uma diluição de 1:50 do DNA extraído uma quantidade de DNA genómico total para enchimento da célula de leitura e procedeu-se à leitura de absorvância a 260 nm e a 280 nm.

Na avaliação da pureza do DNA extraído considerou-se que o DNA puro genómico deve apresentar uma razão $Abs_{(260nm)}/Abs_{(280\text{ nm})}$ entre 1,7 e 1,9.

2.6.4. Identificação genética de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus saprophyticus*

A identificação de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus saprophyticus* baseou-se no método PCR multiplex descrito por Morot-Bizot, Talon & Leroy (2004).

Na reacção PCR multiplex foram utilizados os primers (Stab Vida, Lda FCT/UNL) descritos na Tabela 2.

Estes primers foram seleccionados tendo em conta a compatibilidade termodinâmica e a produção de bandas de PCR electroforeticamente distintas, em tamanho. (Morot-Bizot *et al.*, 2004).

Tabela 2: Primers utilizados na reacção PCR multiplex para identificação das espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus saprophyticus*.

Espécie	Designação do primer	Sequência
<i>Staphylococcus</i> específico	TstaG422	GGCCGTGTTGAACGTGGTCAAATCA
	Tstag765	TIACCATTTCAGTACCTTCTGGTAA
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Xyl F	AACGCGCAACGTGATAAAATTAATG
	Xyl R	AACGCGCAACAGCAATTACG
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sa442-1	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG
	Sa442-2	CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATAACA
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Se705-1	ATCAAAAAGTTGGCGAACCTTTTCA
	Se705-2	CAAAAAGAGCGTGGAGAAAAGTATCA
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Sap1	TCAAAAAGTTTTCTAAAAAATTTAC
	Sap2	ACGGGCGTCCACAAAATCAATAGGA

A amplificação do PCR foi executada com 3 µl de DNA amostra. A mistura de 25 µl continha 0,5 µM dos primers Xyl F/Xyl R, 0,5 µM dos primers Sap1/Sap2, 0,5 µM dos primers Se705-1/Se705-2, 0,5 µM dos primers Sa442/Sa442-1, 0,5 µM dos primers Tstag765 e TstaG422, 2,5 µl de tampão 10x (Roche, USA), 200 µM de cada desoxiribonucleosido trifosfato (dntp's) (GE Healthcare, Inglaterra), 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Roche, USA), 10 µg de soro de albumina bovina por reacção (BSA) e 1U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal). A mistura foi sempre mantida em gelo.

As condições operatórias de amplificação no termociclador (BIORAD, Inglaterra) foram as seguintes: três minutos a 94°C (pré aquecimento), um minuto a 95°C, trinta segundos a 55°C, trinta segundos a 72°C completando 40 ciclos seguindo-se um ciclo de terminação a 72°C três minutos.

Foram utilizadas as seguintes estirpes como controlo positivo: *Staphylococcus epidermidis* ATTC RP62A, *Staphylococcus saprophyticus* DSMZ 18669, *Staphylococcus aureus* ATTC 29213, *Staphylococcus xylosus* ATTC 8166. Como controlo negativo foi utilizada a água MiliQ. Para revelação dos produtos PCR amplificados foi realizada eletroforese. Cinco microlitros do produto amplificado foram colocados em gel de agarose cloning grade (Nzytech, Portugal) a 1,5% em TBE 1X, corado com brometo de etidio (0,001%) (Sigma, USA) aplicando-se uma voltagem de 50V durante 55 minutos, após o que foi visualizado por transluminação em UV (Pharmacia Biotech, Alemanha). Os primers utilizados amplificam os fragmentos de diferentes tamanhos tal como se resume na tabela 3

Tabela 3: Tamanho dos fragmentos amplificados para identificação das espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus xylosus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>	108 bp
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	124 bp
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	221 bp
<i>Staphylococcus específico</i>	370 bp
<i>Staphylococcus xylosus</i>	539 bp

2.6.5. Identificação de *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus simulans*

A identificação de *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus simulans* por PCR foi efectuada de acordo com a metodologia descrita por Blaiotta, Casaburi, Villani (2005).

Foram utilizados os seguintes primers (Stab Vida, Lda., FCT/UNL):

Staphylococcus simulans - sim F (5'-ATCCTTTACC-TAACTCTGAAGAG-3'); sim R (5'-GTAATTGGGTTGTCTTGGTTT GCT-3')

Staphylococcus carnosus - car F (5'-CTTCTAACACCTAATTCTGAAGA-3') e car R (5'-GATTGGATTGTCTTGGTTAGGA-3')

2.6.5.1. Amplificação de fragmento de DNA para identificação de *Staphylococcus simulans*

A amplificação do PCR para a detecção específica do *Staphylococcus simulans* foi executada com 3 µl de DNA amostra. A mistura de 25 µl continha 0,5 µM (de cada) do primer simF e simR, 2,5 µl de tampão 10x (Roche, USA), 0,25 mM de cada desoxiribonucleosido trifosfato (dntp's), 2,5 mM cloreto de magnésio (MgCl₂), e 1U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal). A mistura foi sempre mantida em gelo moído.

As condições operatórias de amplificação no termociclador (BIORAD, Inglaterra) foram as seguintes: três minutos a 95°C (pré aquecimento), cinco segundos a 95°C, trinta segundos a 66°C, trinta segundos a 72°C num total de 30 ciclos e uma finalização a 72°C durante três minutos.

Foi utilizado como controlo positivo a estirpe *Staphylococcus simulans* DSMZ 20323. Como controlo negativo foi utilizada a água MiliQ.

Cinco microlitros do produto amplificado foram revelados através de electroforese sendo depositados num gel de agarose N (GE Healthcare, Inglaterra) a 1,5% em TBE 1X corado com brometo de etidio (0,001%) (Sigma, USA) aplicando-se uma voltagem de 50V durante 55

minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados por transluminância em UV (Pharmacia Biotech, Alemanha).

Os primers utilizados amplificam fragmentos de DNA a 197 bp identificando *Staphylococcus simulans*.

2.6.5.2. Amplificação de fragmento de DNA para identificação de *Staphylococcus carnosus*

A amplificação do PCR para o detecção específica do *Staphylococcus carnosus* foi executada com 3 µl de DNA amostra. A mistura de 25 µl continha 0,5 µM (de cada) do primer carF e carR, 0,25 mM de cada desoxiribonucleosido trifosfato (dntp's) (GE Healthcare, Inglaterra), 2,5 mM cloreto de magnésio (MgCl₂) (Roche, USA), 2,5 µl de tampão 10x (Roche, USA) e 1U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal). A mistura foi sempre mantida em gelo moído.

As condições operatórias de amplificação no termociclador BIORAD (Inglaterra) foram as seguintes: três minutos a 95°C (pré aquecimento), cinco segundos a 95°C, trinta segundos a 60°C, trinta segundos a 72°C durante 30 ciclos e finalização a 72°C durante três minutos.

Foi utilizado como controlo positivo a estirpe *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 e *Staphylococcus carnosus* DSMZ 4600. Como controlo negativo foi utilizada a água MiliQ.

Cinco microlitros do produto amplificado foram revelados e visualizados após electroforese em gel de agarose cloning grade (Nzytech, Portugal) a 1,5% em TBE 1X corado com brometo de etidio (0,001%) (Sigma, USA) aplicando uma voltagem de 50V durante 55 minutos. Os fragmentos foram visualizados por transluminância em UV (Pharmacia Biotech, Alemanha).

Os primers utilizados amplificam os fragmentos de *Staphylococcus carnosus* a 195 bp.

2.6.6. Identificação de fragmento de DNA para identificação de *Staphylococcus equorum*

A metodologia descrita para identificação de *Staphylococcus equorum* baseou-se no protocolo descrito por Blaiotta, Ercolini, Salzano & Villani (2004). Foram utilizados os seguintes primers (Stab Vida, Lda FCT/UNL): SdAEqF (GTG GAG GAC ACT TAA ACC ATT C) e SdAEqR (CAA TTT ACC ATC GTT TAC AAC TAG).

A amplificação do PCR para o detecção específica do *Staphylococcus equorum* foi executada com 3 µl (25 ng) de DNA amostra. A mistura de 20 µl continha 0,5 µM (de cada) do primer SdAEqF e SdAEqR, 0,25 mM de cada desoxiribonucleosido trifosfato (dntp's), (GE Healthcare, Inglaterra), 2,5 mM cloreto de magnésio (MgCl₂) (Roche, USA), 2,0 µl de tampão 10x (Roche, USA) e 1U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal). A mistura foi sempre mantida em gelo moído.

As condições operatórias no termociclador BIORAD (Inglaterra) foram as seguintes: três minutos a 95°C, cinco segundos a 95°C, vinte e cinco segundos a 61°C, trinta segundos a 72°C em 30 ciclos com finalização a 72°C durante três minutos.

Foi utilizado como controlo positivo a estirpe *Staphylococcus equorum* DSMZ 20029 e, como controlo negativo foi utilizada a água MiliQ.

A revelação dos produtos PCR foi efectuada através de electroforese utilizando-se cinco microlitros do produto amplificado num gel de agarose cloning grade (Nzytech, Portugal) a 1,5% em TBE 1X corado com brometo de etídio (0,001%) (Sigma, USA) aplicando uma voltagem de 50V durante 55 minutos. A visualização do fragmento foi feita por transiluminância em UV (Pharmacia Biotech, Alemanha).

Os primers utilizados amplificam os fragmentos de *Staphylococcus equorum* a 193 bp.

2.7. PCR fingerprinting

A metodologia descrita está de acordo com o protocolo preconizado por Tenreiro, 2007.

Foi utilizado o primer M13 (Stab Vida, Lda., FCT/UNL): Sequência (5' – 3'): GAGGGTGGCGGTTCT

A amplificação por PCR foi executada com 1 µl de DNA amostra. A mistura de 25 µl continha 2 mM do primer M13, 200 µM de desoxiribonucleosidos trifosfato (dntp's) (GE Healthcare, Inglaterra), 3,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Roche, USA), 2,5 µl de tampão 10x (Roche, USA) e 1U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal).

Foi preparado como controlo negativo um tubo em que o DNA foi substituído por água miliQ.

As condições operatórias no termociclador BIORAD (Inglaterra) foram as seguintes: um ciclo de cinco minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de um minuto a 95°C, dois minutos a 40°C e dois minutos a 72°C, finalizando com um ciclo a 72°C durante dez minutos.

Dez microlitros do produto amplificado foram visualizados em gel de agarose cloning grade (Nzytech, Portugal) a 1,5% em TBE 1X aplicando uma voltagem de 70V durante 4 horas. Foi utilizado uma solução de marcador 100 bp (Nzytech, Portugal).

O gel de agarose foi mergulhado em banho de uma solução de TBE 1x com 1 µg/ml de brometo de etídio durante 30 minutos após o que foi revelado por transiluminação em UV (Pharmacia Biotech, Alemanha).

2.8. Selecção dos isolados para provas de interesse tecnológico

A selecção dos isolados teve como base o seu perfil genético obtido por fingerprinting escolhendo-se representantes dos grupos (clusters) de clones de estirpes de cada espécie e em função da origem das amostras.

2.9. Provas de interesse tecnológico

Estirpes seleccionadas das provas anteriormente descritas foram caracterizadas através de avaliação da actividade proteolítica, lipolítica, nitrato redutase. Foram avaliadas 4 estirpes de *Staphylococcus carnosus*, 5 estirpes de *Staphylococcus epidermidis*, 10 estirpes de *Staphylococcus xylosus*, 8 estirpes de *Staphylococcus equorum*, 6 estirpes de *Staphylococcus saprophyticus*, 10 estirpes de *Staphylococcus* género (sem identificação de espécie) representativas de cada grupo no dendograma do fingerprinting. Para a avaliação do crescimento em diferentes condições de temperatura, cloreto de sódio e pH foram seleccionadas 6 estirpes de *Staphylococcus xylosus* e 4 estirpes de *Staphylococcus equorum*. Foram igualmente avaliados os padrões dos *Staphylococcus* em estudo.

2.9.1. Determinação da Actividade proteolítica

Com o auxílio de uma micropipeta depositou-se no meio de cultura (A), 10 µl da cultura da estirpe seleccionada após crescimento em BHI apresentando uma absorvância a 625 nm de 0,8 a 1,0. Incubou-se a 30°C durante 48 horas.

Ao fim do tempo previsto inundou-se a placa com a solução (B). O aparecimento de um halo opaco indicou a presença de actividade proteolítica. Mediu-se, com o auxílio de uma régua, o halo formado e registou-se o valor obtido.

¹

2.9.2. Determinação da Actividade lipolítica

Com o auxílio de uma micropipeta depositou-se no meio Spirit Blue Agar (Becton Dickinson, França), 10 µl da cultura da estirpe seleccionada após crescimento em BHI apresentando uma

(A) A 6 g do Meio de cultura PCA (Scharlau, Espanha), 25 g de gelatina e peptona (Scharlau, Espanha) e leite em pó magro (12,5 g para 100 ml de água destilada utilizando 10 ml desta solução para cada 100 ml de meio).

(B) Para a solução de bicloreto de mercúrio (Merck, Alemanha) a 1,5% de bicloreto de mercúrio.¹

absorvância a 625 nm de 0,8 a 1,0. Incubou-se a 30°C durante 48 horas. O aparecimento de halo indicou a presença de actividade lipolítica.

Mediu-se, com o auxílio de uma régua, o halo formado e registou-se.

2.9.3. Determinação da actividade nitrato redutase

Com o auxílio de uma micropipeta depositou-se no meio de cultura (C), 10 µl da cultura da estirpe seleccionada após crescimento em BHI apresentando uma absorvância a 625 nm de 0,8 a 1,0. Incubou-se a 30°C durante 24 horas, 20°C durante 48 horas e a 15°C durante 72 horas.

Ao fim dos tempos de incubação preconizados a placa foi inundada com uma solução de NIT1:NIT2 (Merck, Alemanha). O aparecimento de halo roxo indicou a presença de actividade nitrato redutase. Mediu-se, com o auxílio de uma régua, o halo formado e registou-se. A intensidade da coloração foi apreciada qualitativamente com “+”, “++”, “+++” e “++++”.

2.9.4. Determinação do efeito da temperatura, pH e cloreto de sódio

Efeito da temperatura:

Para o estudo do efeito da temperatura no desenvolvimento e crescimento das estirpes de *Staphylococcus* seleccionadas estudaram-se três temperaturas de incubação diferentes: 10°C, 15°C e 20°C.

Com o auxílio de uma micropipeta efectuou-se a sementeira de 1 ml da cultura da estirpe seleccionada e cultivada em caldo BHI apresentando uma absorvância a 625 nm de 0,8 a 1,0, em meio caldo (D). Efectuou-se leituras de 2 em 2 horas aproximadamente. Registou-se o valor lido.

Efeito do pH e temperatura:

Para este caso estudou-se o desenvolvimento e crescimento das estirpes de *Staphylococcus* seleccionadas em caldo com diferentes valores de pH: 5.0 e 5.5. Para cada valor de pH variou-se a temperatura (15°C e 20°C).

² (C) O meio de cultura utilizado foi o Levedura Triptona Agar constituído por 1,0% de triptona (casein tryptic peptone), (Scharlau, Espanha); 0,5% extracto de levedura (Yeast extract – Scharlau, Espanha); 1,5% agar (agar bacteriological nº 1, Oxoid, Inglaterra) a pH 7,0 suplementado com 1g/litro de nitrato de potássio (Merck, Alemanha).

Efectuou-se, em duplicado, a sementeira de cada estirpe seleccionada e cultivada em caldo BHI com uma concentração de 0,8 a 1,0 de absorvância a 625 nm para tubos contendo caldo (D) pH 5,0 e pH 5,5. Incubou-se a 15°C e 20°C. Efectuou-se leituras de 2 em 2 horas aproximadamente. Registou-se o valor lido.

Efeito do cloreto de sódio:

Para o estudo do efeito da concentração de cloreto de sódio no desenvolvimento e crescimento das estirpes de *Staphylococcus* seleccionadas estudaram-se duas diferentes concentrações de cloreto de sódio: 10% e 15%.

Com o auxílio de uma micropipeta efectuou-se a sementeira de 1 ml da cultura da estirpe seleccionada e cultivada em caldo BHI apresentando uma absorvância a 625 nm de 0,8 a 1,0, em meio caldo (D) suplementado com 10 e 15% de cloreto de sódio. Efectuou-se leituras de 2 em 2 horas aproximadamente. Registou-se o valor lido.

2.10. Análise estatística

Efectuou-se uma análise descritiva dos resultados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007. A descrição é feita com a apresentação dos resultados em percentagem e através de gráficos de linhas com a evolução da absorvância ao longo do tempo (horas).

Os perfis de fingerprinting obtidos para cada isolado foram introduzidos no programa informático Bionumerics (versão 4.61 [Applied Maths, Kortrijk, Belgium]), tendo sido construídos dendogramas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA - unweighted pair group method with arithmetic average).

³ (D) O meio de cultura utilizado foi o caldo Levedura Triptona Agar constituído por 1,0% de triptona (casein tryptic peptone, Scharlau, Espanha) e 0,5% extracto de levedura (Yeast extract – Scharlau, Espanha)

Capítulo 3: Apresentação de resultados

3.1. Caracterização fenotípica dos isolados: morfologia das colônias e utilização do manitol

Dos 107 isolados que integraram este estudo, 104 eram gram +, catalase positivo e oxidase negativo. Foi possível observar que os isolados desenvolveram-se e toleraram a presença de 7,5% a 10% de NaCl presente no meio Manitol Salt Agar (MSA). O crescimento e tamanho das colônias dos isolados em estudo no meio MSA foram variáveis, sem possibilidade de se estabelecer qualquer relação com a capacidade de utilização do manitol.

Nas Figuras 1, 2 e 3 podem observar-se exemplos de isolados estudados que apresentaram diferentes velocidades de utilização e fermentação do manitol presente no meio MSA com mudança da sua cor, devida ao vermelho de fenol, para amarelo, assim como colônias de diferentes tamanhos após o período de incubação de 48 horas a 37°C. Os isolados P06-14 e P06-52 utilizaram lentamente o manitol do Meio Manitol salt agar. O isolado P06-36 não fermentou o manitol não alterando a cor do meio. O isolado P06-47 fermentou o açúcar manitol libertando ácido, o que vai originar alteração do pH do meio MSA e consequentemente da sua cor que vira para amarelo.

Figura 1 – Isolados P06-14 (A) e P06-52 (B) de *Staphylococcus* spp. que evidenciaram uma utilização lenta do meio Manitol Salt Agar

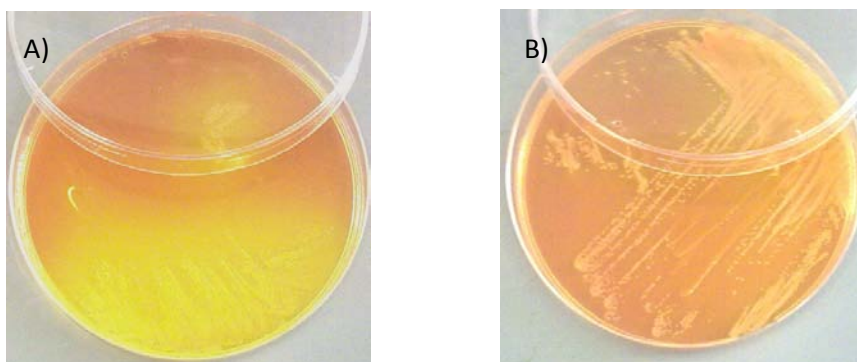
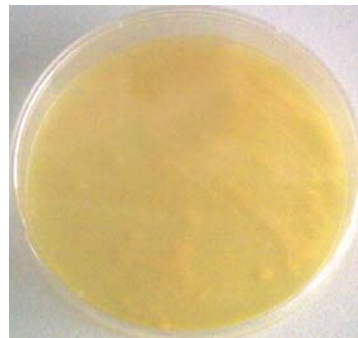


Figura 2 - Isolado *Staphylococcus* P06-36 que não utilizou o manitol



Figura 3 - Isolado *Staphylococcus* P06-47 que fermentava o manitol



Os 104 isolados de presuostos *Staphylococcus* apresentaram diferentes capacidades metabólicas, uma vez que nem todos metabolizaram o manitol. Assim, apenas 57% (59) utilizaram o manitol, fermentando-o com produção de ácido e consequente alteração do indicador (vermelho de fenol) de vermelho para amarelo, 22% (2) evidenciaram uma metabolização lenta e 21% (22) não utilizaram o manitol.

A Tabela 4 apresenta, em percentagem, os isolados que metabolizaram o açúcar manitol existentes em cada uma das Unidades Fabris alvo de estudo. Assim, na Unidade Fabril A vinte e oito dos isolados (60%) metabolizavam o manitol, sete (15%) metabolizavam-no lentamente e doze (25%) não o metabolizavam. Na Unidade Fabril B trinta e um dos isolados (54%) metabolizavam o açúcar manitol, dezasseis (28%) metabolizavam-no lentamente e dez (18%) não o utilizavam.

Tabela 4 - Fermentação do manitol pelos isolados de *Staphylococcus* em função das Unidades Fabris

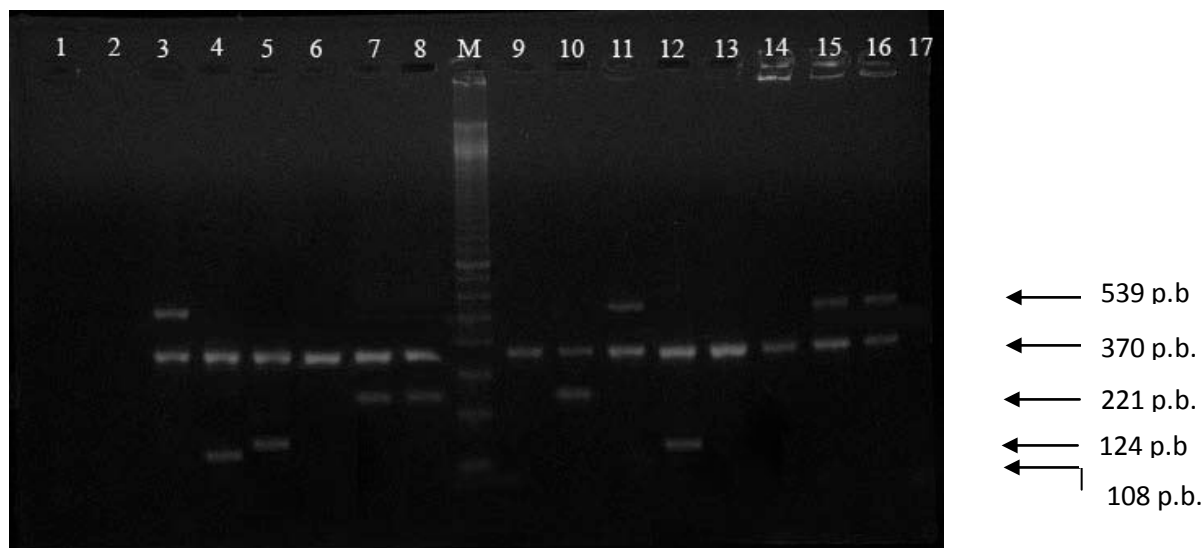
Origem do isolado	Fermentação manitol (%)	Fermentação lenta manitol (%)	Não utilização do manitol	Total (%)
Unidade Fabril A	60	15	25	100
n = 47	(n=28)	(n=7)	(n=12)	
Unidade Fabril B	54	28	18	100
n = 57	(n=31)	(n=16)	(n=10)	

3.2. Identificação genotípica de Isolados

Dos 104 isolados identificados pela técnica de PCR Multiplex como pertencentes ao género *Staphylococcus* foi possível identificar trinta e um (30%) isolados como *Staphylococcus xylosus*, vinte e seis (25%) como *Staphylococcus equorum*, dezanove (18%) foram apenas identificados como *Staphylococcus* spp, doze (11%) como *Staphylococcus carnosus*, dez (10%) como *Staphylococcus saprophyticus*, seis (6%) como *Staphylococcus epidermidis*. Na Figura 4 apresenta-se a fotografia do gel obtido após electroforese e que permitiu visualizar os produtos da técnica PCR multiplex e aplicada a alguns dos isolados em estudo para identificação de *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus* spp e *Staphylococcus aureus*. A estirpe padrão *Staphylococcus aureus* (ATTC 29213) apresentou um fragmento amplificado com 108 p.b (pares de bases), enquanto para o *Staphylococcus epidermidis* (RP 62A) o fragmento amplificado foi de 124 p.b., No *Staphylococcus saprophyticus subespecie bovis* (DSMZ 18669) o fragmento amplificado continha 221 p.b., em isolados do género *Staphylococcus* spp o fragmento amplificado apresentou 370 p.b. e, finalmente para o *Staphylococcus xylosus* houve amplificação de um fragmento com 539 p.b.

Os isolados P06-34 e P05-5, correspondentes às linhas nº 1 e 2 da Figura 4, não apresentaram amplificação de qualquer um dos primers iniciadores presentes na reacção pelo que não foram considerados como pertencentes ao género *Staphylococcus*. Os isolados P06-20, P06-09 e P05-71 nas linhas nºs 6, 9 e 13 apresentaram hibridação e amplificação dos primers que tem um produto com 370 p.b. pelo que foram identificados como pertencentes ao género *Staphylococcus*. Os isolados P05-28 e P05-70 na linha 8 e 10 respectivamente apresentavam produtos de reacção com 221 p.b. e 370 p.b. pelo que foram identificados como pertencentes ao género *Staphylococcus* e espécie *saprophyticus*. Os isolados P06-01, P05-86 e P06-105, correspondentes às linhas 11, 15 e 16, apresentavam produtos de reacção amplificados com 370 p.b. e 539 p.b. pelo que foram identificados como pertencentes ao género *Staphylococcus* e espécie *xylosus*. O isolado P06-89 na linha 5, apresentou hibridação tendo sido evidenciado produtos de reacção amplificados com 124 p.b. e 370 p.b. pelo que foi identificado como pertencente ao género *Staphylococcus* e espécie *epidermidis*.

Figura 4- Identificação de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus* spp pela técnica Multiplex PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.



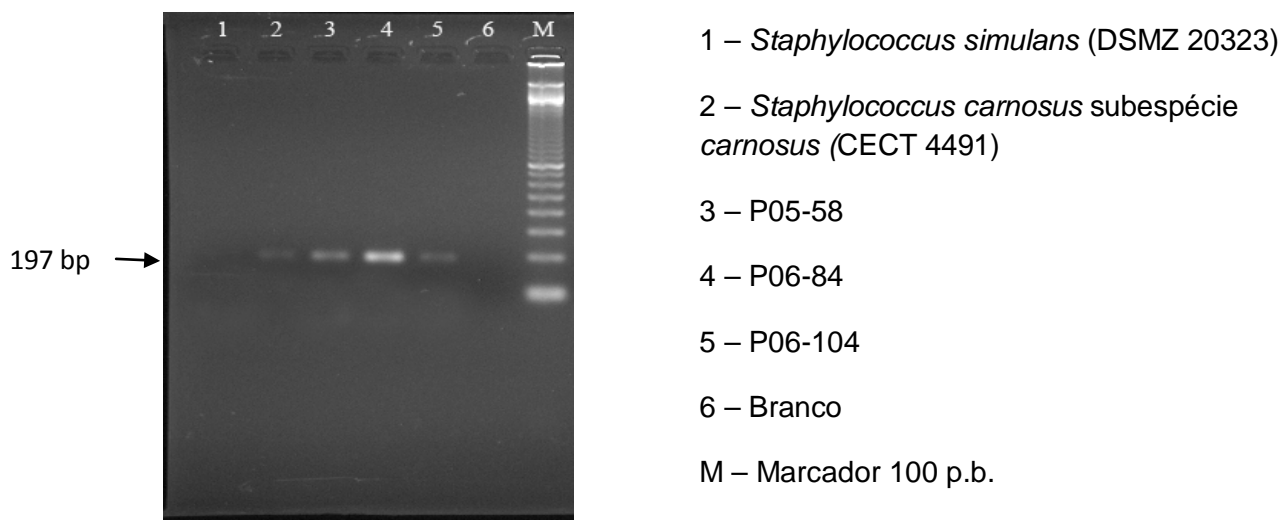
1 – P06-34; 2 – P05-05; 3 – *Staphylococcus xylosus* (refª 8166); 4- *Staphylococcus aureus* (ATTC 29213); 5- P06-89; 6 – P06-20; 7 - *Staphylococcus saprophyticus* subespécie bovis (DSMZ 18669); 8– P05-28; M Marcador 100 p.b; 9 – P06-09; 10 – P05-70; 11 – P06-01; 12 – *Staphylococcus epidermidis* (RP 62A); 13 P05-71; 14 – *Staphylococcus* spp; 15 – P05-86; 16 – P06-105; 17 - Branco

Dos isolados identificados para o género *Staphylococcus* identificados pela técnica PCR multiplex: doze isolados (11%) foram identificados genotipicamente como *Staphylococcus carnosus*.

Na Figura 5 pode-se observar o gel de agarose resultante da electroforese efectuada com os produtos de PCR espécie-específico para o *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus carnosus*, podendo-se observar para o padrão *Staphylococcus carnosus* (CECT 4491) um fragmento amplificado de 197 p.b. enquanto para o padrão *Staphylococcus simulans* (DSMZ 20323) tal não acontece confirmando-se assim a especificidade dos primers utilizados.

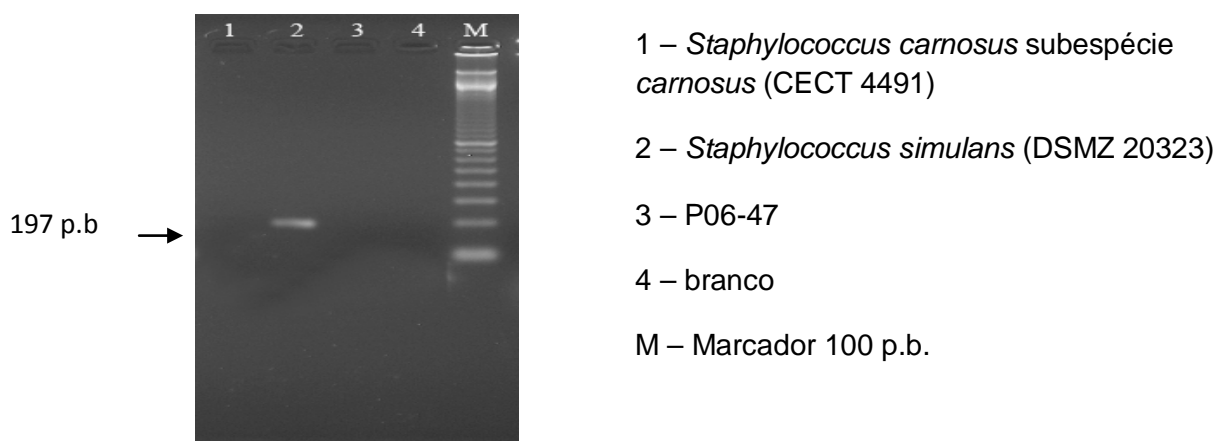
Os isolados P05-58, P06-84 e P06-104 correspondentes a isolados nas linhas nº 3, 4 e 5 da Figura 5 apresentaram hibridação e amplificação dos primers com um produto de reacção de 197 p.b. pelo que foram identificados como *Staphylococcus carnosus*.

Figura 5 - Identificação de *Staphylococcus carnosus* pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.



Na Figura 6 apresenta-se um gel de agarose após electroforese dos produtos de PCR espécie-específico para identificação de *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus carnosus*. Observou-se para o padrão *Staphylococcus simulans* (DSMZ 20323) um fragmento amplificado com 197 p.b. enquanto para o padrão *Staphylococcus carnosus* (CECT 4491) não se evidenciou qualquer fragmento confirmando-se assim a especificidade dos primers utilizados. O isolado P06-47, correspondente à linha nº 3 na Figura 6 não apresentou produto da reacção pelo que se conclui que não houve hibridação dos primers e amplificação, não sendo assim identificado como *Staphylococcus simulans*. De salientar que nenhum dos isolados estudados como pertencentes ao género *Staphylococcus* foram identificados genotipicamente como *S.simulans*.

Figura 6 - Identificação de *Staphylococcus simulans* pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.

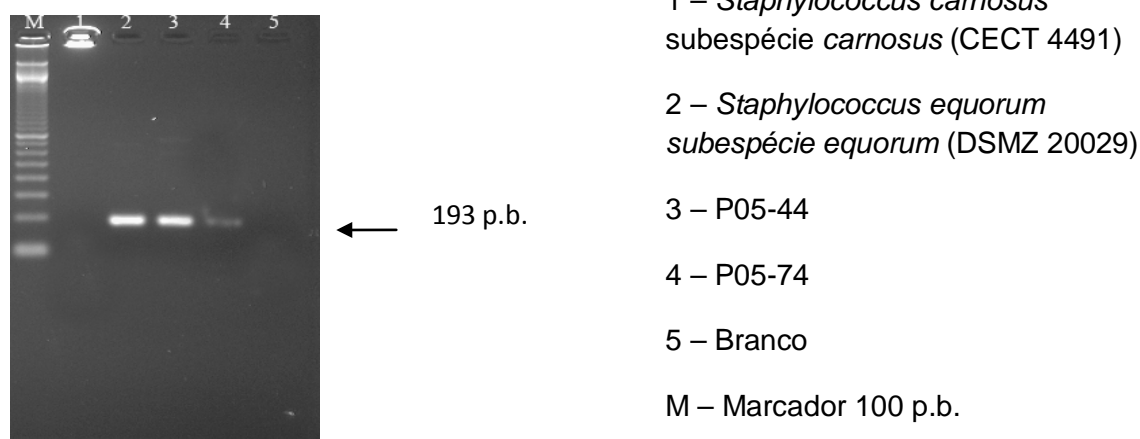


A Figura 7 representa o gel resultante do PCR espécie-específico para identificação de *Staphylococcus equorum* podendo observar-se para o padrão *Staphylococcus equorum* subespécie *equorum* (DSMZ 20029) um fragmento amplificado com 193 p.b. enquanto, para o padrão *Staphylococcus carnosus* (CECT 4491) tal não acontece, confirmando-se assim a especificidade dos primers utilizados.

Os isolados P05-44 e P05-74 correspondentes às amostras nas linhas nº 3 e 4 da Figura 7 apresentaram hibridação dos primers e amplificação, tendo sido evidenciado produto de reacção com 193 p.b. pelo que foram identificados como *Staphylococcus equorum*.

Do total de isolados estudados, vinte e seis (25%) foram identificados genotipicamente como *Staphylococcus equorum*.

Figura 7 - Identificação de *Staphylococcus equorum* pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.



Na Tabela 5 apresenta-se a distribuição dos isolados identificados genotipicamente (em %) pelas duas Unidades Fabris (A e B).

A Unidade Fabril A apresentou maioritariamente isolados de *Staphylococcus equorum* (23) encontrando-se os restantes vinte e quatro isolados distribuídos entre *Staphylococcus saprophyticus* (9), *Staphylococcus carnosus* (1), *Staphylococcus epidermidis* (1) e *Staphylococcus xylosus* (1) e *Staphylococcus* spp (12) não identificados à espécie.

Na Unidade Fabril B foram identificados maioritariamente *Staphylococcus xylosus* (30), encontrando-se os restantes 27 isolados distribuídos entre *Staphylococcus carnosus* (11), *Staphylococcus epidermidis* (5), *Staphylococcus equorum* (3) e *Staphylococcus saprophyticus* (1). Sete isolados foram apenas identificados no género.

Tabela 5 – Identificação de estirpes relacionadas com as indústrias de salsicharia de origem

Identificação de isolados	Unidade fabril A n = 47	Unidade Fabril B n = 57
<i>S. xylosus</i> (%)	2	53
<i>S. equorum</i> (%)	49	5
<i>S. carnosus</i> (%)	2	19
<i>S. epidermidis</i> (%)	2	9
<i>S. saprophyticus</i> (%)	19	2
<i>Staphylococcus</i> spp (%)	26	12
Total (%)	100	100

Nas amostras colhidas nas Unidades Fabris alvo de estudo não foram identificados *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus simulans*.

Na Tabela 6 é apresentada, em percentagem, a distribuição das estirpes identificadas genotipicamente pelas diversas origens ou pontos de colheita de amostra nomeadamente massa do chouriço (massa após 48 horas de maturação, massa após enchimento e produto acabado), ingrediente utilizado no fabrico (tripa), e superfícies de trabalho nomeadamente a caixa, mesa, faca, máquina de enchimento e câmara de refrigeração.

Assim, na Unidade Fabril A, constatou-se a presença de quarenta e sete (47) isolados de *Staphylococcus* distribuídos do seguinte modo: nas amostras de tripa foi identificado apenas um isolado de *Staphylococcus* spp, nas amostras colhidas da caixa foram identificadas oito (8) estirpes em que seis (6) eram de *Staphylococcus equorum* e duas (2) *Staphylococcus* spp, nas amostras colhidas da superfície das facas foram identificados onze (11) isolados sendo quatro (4) *Staphylococcus saprophyticus* e dois (2) *Staphylococcus equorum*, os restantes pertenciam ao género *Staphylococcus*. Nas amostras da massa após 48 horas de maturação foram isolados *Staphylococcus equorum* (n=2) e *Staphylococcus xylosus* (n=1). Nas amostras colhidas após enchimento foi identificado um (1) isolado de *Staphylococcus epidermidis*. Nas amostras de produto acabado analisadas foram identificados: quatro (4) isolados de *Staphylococcus saprophyticus*, um (1) de *Staphylococcus carnosus*, dois (2) de *Staphylococcus equorum* e dois de *Staphylococcus* spp. Nas amostras recolhidas na mesa de trabalho foram identificados seis (6) isolados de *Staphylococcus equorum* e um (1) de *Staphylococcus saprophyticus*. Nas amostras recolhidas da máquina de enchimento foram identificados seis (6)

isolados dos quais quatro (4) eram *Staphylococcus equorum* e dois (2) de *Staphylococcus spp.*. Por fim, na câmara de refrigeração foi identificado um (1) isolado de *Staphylococcus equorum*.

Tabela 6 – Distribuição dos isolados identificados na Unidade Fabril A pelos pontos de colheita: massa de enchido tradicional fermentado e fumado (chouriço), ingredientes secundários (tripa) e superfícies de trabalho (caixa, câmara de refrigeração, máquina de enchimento, mesa e faca)

Unidade fabril A n = 47	S. xylosus (%)	S. equorum (%)	S. carnosus (%)	S. epidermidis (%)	S. saprophyticus (%)	Staphylo coccus spp. (%)	Total
Massa após enchimento (n=1)	_____	_____	_____	100	_____	_____	100
Massa após metade do tempo de fumagem (n=3)	33	67	_____	_____	_____	_____	100
Produto acabado (n=9)	_____	22	11	_____	45	22	100
Tripa (n=1)	_____	_____	_____	_____	_____	100	100
Enchedora (n=6)	_____	67	_____	_____	_____	33	100
Mesa (n=7)	_____	86	_____	_____	14	_____	100
Faca (n=11)	_____	18	_____	_____	36	46	100
Caixa (n=8)	_____	75	_____	_____	_____	25	100
Câmara de refrigeração (n=1)	_____	100	_____	_____	_____	_____	100

Tabela 7 – Distribuição dos isolados identificados na Unidade Fabril B pelos pontos de colheita: massa de enchido tradicional fermentado e fumado (chouriço), ingredientes secundários (alho e tripa) e superfícies de trabalho (picadora)

Unidade Fabril B n=57	S. <i>xylosus</i> (%)	S. <i>equorum</i> (%)	S. <i>carneus</i> (%)	S. <i>epidermidis</i> (%)	S. <i>saprophyticus</i> (%)	<i>Staphylo</i> <i>coccus</i> spp (%)	Total (%)
Massa após enchimento (n=3)	33,33	_____	_____	33,33	_____	33,33	100
Massa após metade do tempo fumagem (n=23)	61	4	26	_____	_____	9	100
Produto acabado (n=19)	63	10,5	10,5	_____	_____	16	100
Tripa (n=4)	25	_____	_____	50	_____	25	100
Alho (n=6)	33	_____	50	_____	17	_____	100
Picadora (n=2)	_____	_____	_____	100	_____	_____	100

Na Tabela 7 apresenta-se, em percentagem, a distribuição dos isolados identificados genotipicamente pelas diversas origens ou pontos de colheita de amostra nomeadamente massa do chouriço (massa após 48 horas de maturação, massa após enchimento e produto acabado), ingredientes utilizados no fabrico (alho e tripa) e superfícies (picadora).

Assim, na Unidade Fabril B constatou-se a presença de 57 isolados de *Staphylococcus* distribuídos do seguinte modo: nas amostras de alho foram identificados seis (6) isolados sendo dois (2) de *Staphylococcus xylosus*, três (3) de *Staphylococcus carneus* e, um (1) de *Staphylococcus saprophyticus*. Nas amostras de tripa foram isolados: dois (2) *Staphylococcus epidermidis*, um (1) de *Staphylococcus xylosus* e um (1) *Staphylococcus spp*. Nas amostras de

massa após 48 h de maturação vinte e três (23) isolados foram identificadas como *Staphylococcus xylosus* (n=14), *Staphylococcus carnosus* (n=6), *Staphylococcus* spp, (n=2) e *Staphylococcus equorum* (n=1).

Nas amostras de massa após enchimento foram identificados três (3) isolados, um (1) de *Staphylococcus epidermidis*, outro de *Staphylococcus xylosus* e, outro de *Staphylococcus* spp. Nas amostras de produto acabado vinte (19) isolados foram identificados como (12) *Staphylococcus xylosus*, (3) *Staphylococcus* spp, (2) *Staphylococcus carnosus* e (2) *Staphylococcus equorum*. Por fim, nas amostras retiradas da picadora foram identificados 2 isolados de *Staphylococcus epidermidis*.

Tabela 8 – Identificação genotípica versus capacidade de fermentação do manitol

	S. <i>xylosus</i> (%)	S. <i>equorum</i> (%)	S. <i>carnosus</i> (%)	S. <i>epidermidis</i> (%)	S. <i>saprophyticus</i> (%)	<i>Staphylococcus</i> spp (%)	Total (%)
Fermenta manitol (n=59)	36	22	8,5	—	8,5	25	100
Fermentação lenta manitol (n=23)	39	30	17	—	5	9	100
Não reduz o manitol (n=22)	5	27	14	27	18	9	100

A Tabela 8 relaciona a identificação genotípica com a capacidade de fermentação do açúcar manitol dos isolados em estudo.

Constatou-se que dos cinquenta e nove (59) isolados que fermentavam o manitol, vinte e um (36%) eram *S. xylosus*, quinze (25%) *Staphylococcus* spp, treze (22%) *S. equorum*, cinco (8,5%) *S. carnosus* e cinco (8,5%) *S. saprophyticus*.

Dos vinte e três (23) isolados que fermentavam lentamente o manitol, nove (39%) eram *S. xylosus*, sete (30%) eram *S. equorum*, quatro (17%) eram *S. carnosus*, dois (9%) eram *Staphylococcus* spp e, um (5%) era *S. saprophyticus*.

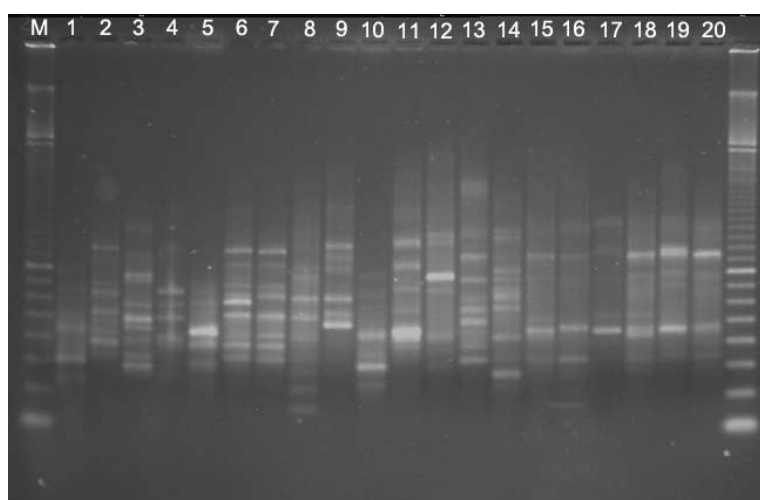
Relativamente aos isolados que não reduziam o manitol constatou-se que, dos vinte e dois (22) isolados: seis (27%) eram *S. equorum*, seis (27%) *S. epidermidis*, quatro (18%) *S. saprophyticus*., três (14%) *S. carnosus*, dois (9%) *Staphylococcus* spp e, um (5%) *S. xylosus*.

3.3. PCR fingerprintings

A partir do DNA previamente extraído foi realizada uma reacção de PCR com o objectivo de amplificação de diferentes regiões do genoma tendo como resultado um conjunto de bandas de DNA que caracterizam cada microrganismo.

Na Figura 8 apresenta-se um exemplo do *fingerprinting* (impressão digital) de algumas estirpes alvo de estudo visualizado em gel de agarose.

Figura 8 –PCR *fingerprinting* de estirpes de *Staphylococcus* em estudo



M-Marcador; 1-P06-98, 2-P06-99, 3-P06-100, 4-P06-101, 5-P06-102, 6-P06-103, 7-P06-104, 8-P06-105, 9-P06-27, 10-P06-09, 11-P05-71, 12-P05-17, 13-P06-82, 14-P05-22, 15-P06-29, 16-P06-77, 17- *S.xylosus* (ref1866), 18- *S. equorum* (DSMZ20029), 19- *S. saprophyticus* (DSMZ18669), 20- *S.carnosus* (DSMZ4600), M-Marcador

As Figuras 9,10,11,12,13 e 14 representam os dendrogramas que foram originados a partir dos géis de agarose resultantes da electroforese efectuada com os produtos da reacção PCR *Fingerprinting* com o primer M13, onde foram aplicadas todas as estirpes em estudo (n=104) após análise no programa *Bionumerics*.

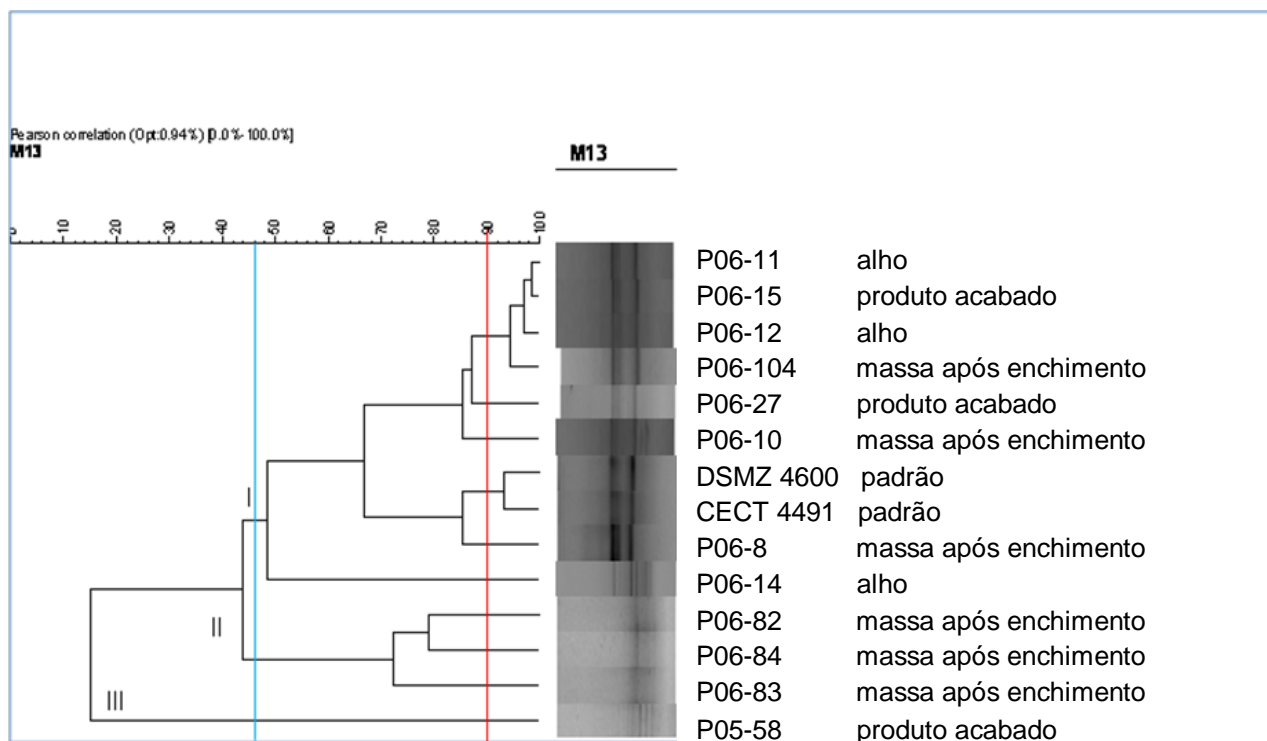
Cerca de 70 dos 104 isolados foram analisados em duplicado tendo-se obtido um índice de reprodutibilidade de 90%.

Da análise do perfil genético das estirpes de *Staphylococcus carnosus* estudadas (Figura 9) estabeleceram-se três grandes grupos cujas semelhanças entre eles eram inferiores a 45%: I) P06-11, P06-15, P06-12, P06-104, P06-27, P06-10, P06-08 e P06-14 que se distribuíam entre amostras de alho, massa após enchimento e produto acabado da Unidade Fabril B. Os padrões DSMZ 4600 e CECT 4491 estavam também incluídos neste grupo apresentando uma semelhança superior a 90% podendo ser considerados idênticos; II) P06-82, P06-83 e P06-84

todos pertencentes a amostras colhidas na mesma Unidade Fabril após enchimento; III) P05-58 que pertencia a uma amostra de produto acabado da Unidade Fabril A.

Dentro de cada grupo, as estirpes que apresentaram um grau de semelhança superior a 90%, podem ser consideradas idênticas, caso os restantes testes efectuados sejam semelhantes. Na Figura 9 é possível distinguir 4 estirpes com perfis genéticos com uma semelhança superior a 90%: P06-11, P06-15, P06-12 e P06-104 com uma sequência lógica ao nível do tipo de amostra uma vez que se trata de estirpes isoladas em alho, massa após enchimento e produto final da mesma Unidade Fabril.

Figura 9 – Dendrograma da análise do perfil genético obtido por PCR *Fingerprinting* das estirpes de *Staphylococcus carnosus* (A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança obtido).

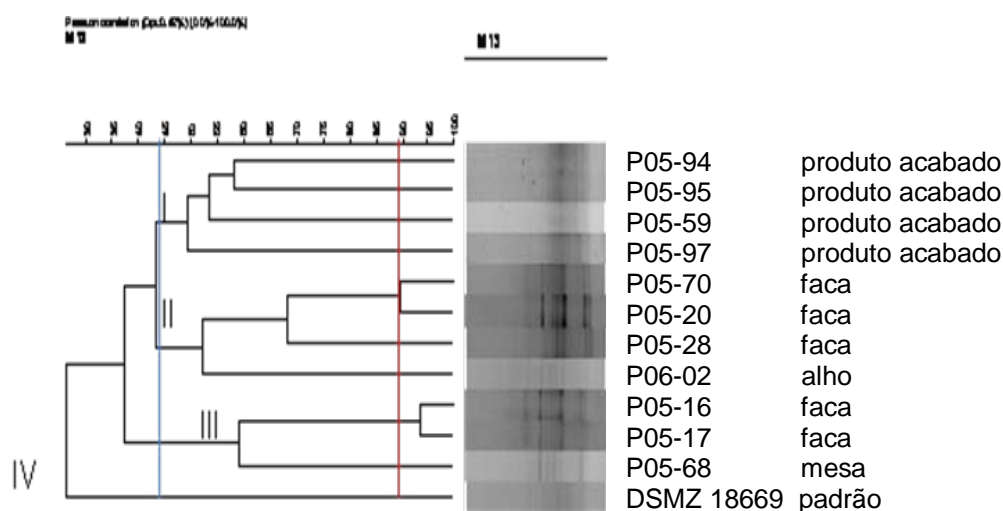


Da análise do perfil genético das estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* estudadas (Figura 10) estabeleceram-se quatro grandes grupos cujas semelhanças eram inferiores a 45%: I) P05-94, P05-95, P05-59, P05-97; II) P05-70, P05-20, P05-28 e P06-02; III) P05-16, P05-17 e P05-68. As estirpes P05-70 e P05-20 ambas isoladas de amostras colhidas na superfície faca apresentam perfis genéticos com uma semelhança entre si de 90% podendo considerar-se estirpes idênticas assim como a P05-16 e P05-17 isoladas de amostra colhida na mesma superfície que apresentam uma semelhança de 94%;

O grupo I) inclui perfis genéticos de estirpes provenientes de amostras colhidas no produto final na Unidade Fabril A, e os grupos II) e III) estirpes provenientes de amostras colhidas na superfície faca.

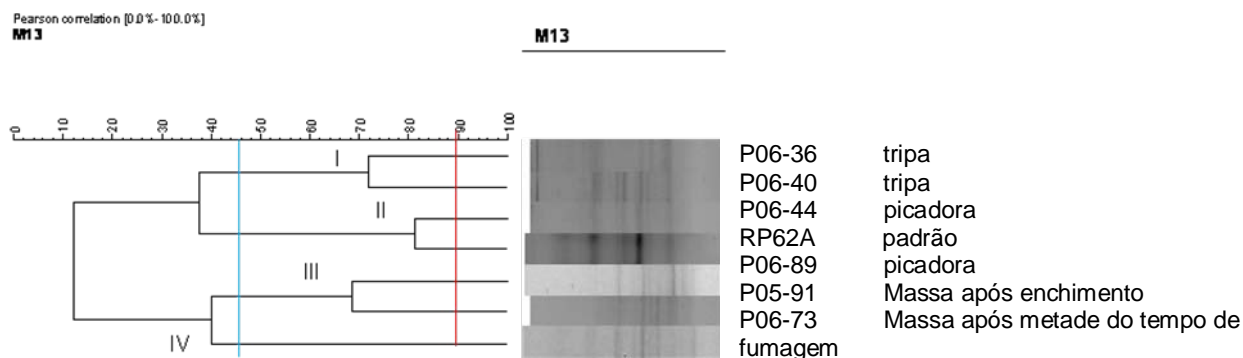
De realçar o facto do padrão *Staphylococcus saprophyticus* DSMZ 18669 (grupo IV) não estar incluído em nenhum dos grupos mencionados apresentando mesmo um perfil genético com uma semelhança inferior a 30% com os 3 grupos formados.

Figura 10 – Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus saprophyticus* obtido por PCR *Fingerprinting* (A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de *clusters*)



Pela análise da Figura 11 que apresenta o perfil genético das estirpes de *Staphylococcus epidermidis* estudadas estabeleceram-se quatro grupos com semelhanças inferiores a 45%: I) P06-36, P06-40 ambas as amostras colhidas da tripa; II) P06-44 amostra colhida da picadora que apresentava uma semelhança de cerca de 80% com o padrão RP62A. A estirpe P06-89 colhida na picadora agrupava-se com a estirpe 91 da Unidade Fabril A colhida da massa após enchimento. O grupo IV incluía apenas a estirpe 73 colhida na massa após metade do tempo de fumagem da Unidade Fabril B.

Figura 11– Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus epidermidis* obtido por PCR *Fingerprinting*. A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de *clusters*.



Pela análise do perfil genético das estirpes de *Staphylococcus equorum* apresentadas na Figura 12 estabeleceram-se seis grandes grupos cujas semelhanças eram inferiores a 45%: I) P05-84, P05-65 e P05-73 onde estavam incluídas as amostras recolhidas na massa após enchimento e da superfície (mesa e caixa); II) P05-23, P05-24, P05-21, P05-26 e P05-69 cujas amostras foram recolhidas das superfícies de trabalho, maioritariamente da caixa; III) P06-57, P05-02, P06-55, P05-54, P05-63, P05-04, P05-07, P05-61, P05-44, P05-53, P06-52 recolhidas não só das superfícies de trabalho (máquina de enchimento e mesa) como também do produto (massa após enchimento e produto acabado). De realçar o facto de estar incluído neste grupo amostras da Unidade Fabril B recolhidas do produto acabado e da massa após enchimento; IV) P05-74 isolada da caixa; V) P05-09, P05-10, P05-12, P05-13 e P05-11; VI) P05-15. As estirpes P05-04 e P05-07 isoladas de superfícies de trabalho apresentaram perfis genéticos com uma semelhança entre si superior a 90%, podendo considerar-se estirpes idênticas, assim como a P05-12 e P05-13 também isoladas de superfícies de trabalho.

Figura 12 – Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus equorum* obtido por PCR *Fingerprinting*. A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de *clusters*.

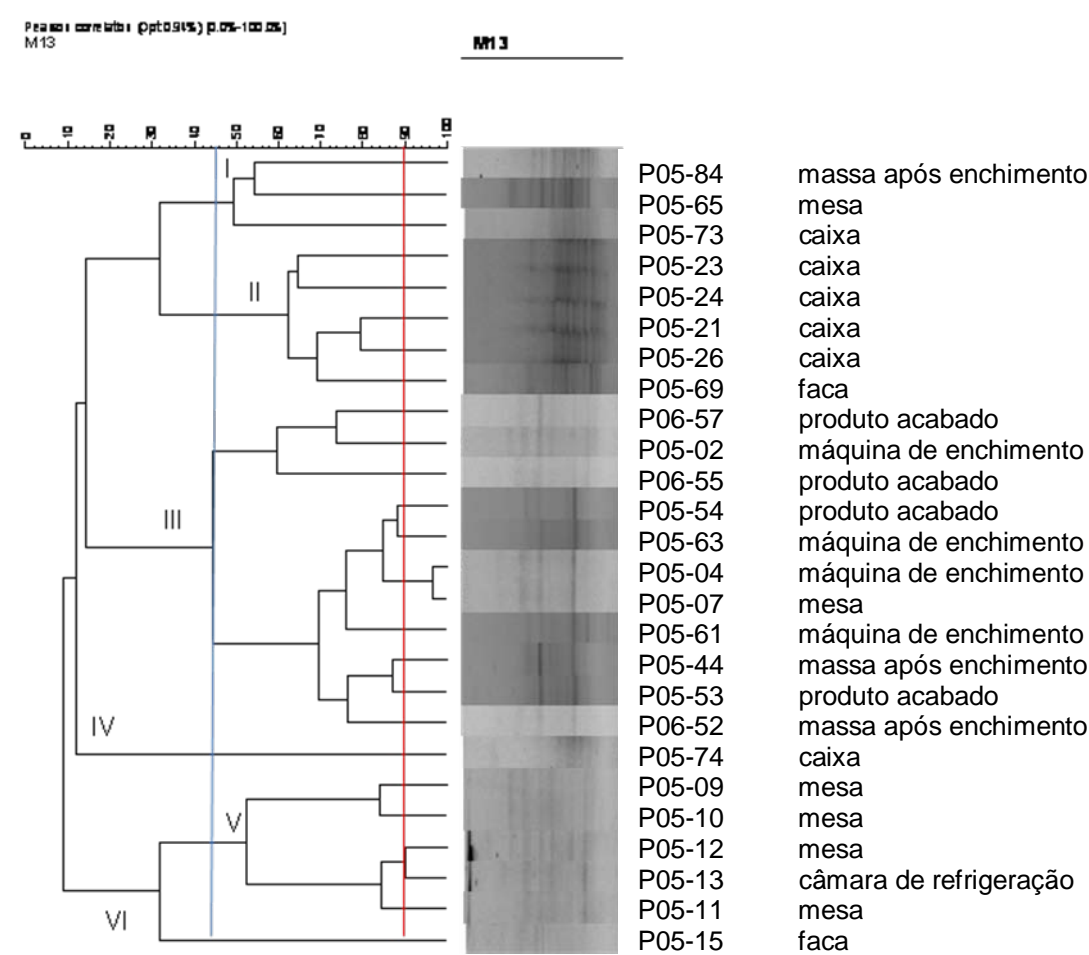
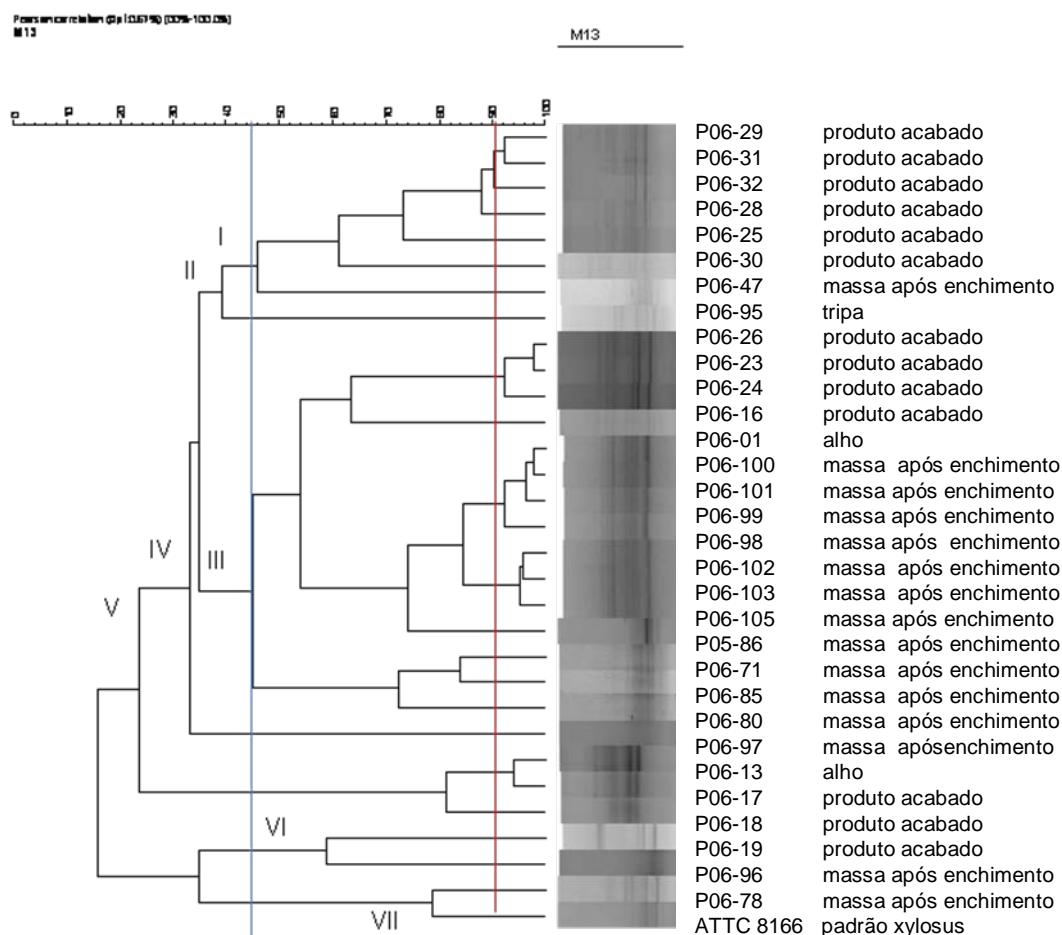


Figura 13 – Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus xylosus* obtido por PCR *Fingerprinting*. A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de *clusters*.



Da análise do perfil genético das estirpes de *Staphylococcus xylosus* estudadas (Figura 13) estabeleceram-se sete grandes grupos cujas semelhanças entre eles eram inferiores a 45%: I) P06-29, P06-31, P06-32, P06-28, P06-25 e P06-30 e P06-47. Neste grupo estão incluídas amostras recolhidas maioritariamente do produto acabado; II) P06-95 retirada da tripa; III) P06-26, P06-23, P06-24, P06-16; P06-01, P06-100, P06-101, P06-99, P06-98, P06-102, P06-103, P06-105 e P05-86, P06-71, P06-85, P06-80 com amostras recolhidas maioritariamente da massa após enchimento. Neste grupo inclui-se a única amostra recolhida na Unidade Fabril A; IV) P06-97 recolhida da massa após enchimento; V) P06-13, P06-17, P06-18 recolhidas do produto acabado e alho; VI) P06-19, P06-96 recolhidas da massa após enchimento e produto acabado; VII) P06-78 recolhida da massa após enchimento. Neste grupo está também incluído o padrão ATTC 8166. As estirpes P06-29, P06-31, P06-32 assim como as estirpes P06-23, P06-24 e P06-26 colhidas no produto acabado apresentam perfis genéticos com uma

semelhança entre si de 90% podendo considerar-se estirpes idênticas assim como as estirpes P06-100, P06-101, P06-102, P06-103, P06-99, P06-98 colhidas na massa após enchimento e a P06-01 no ingrediente alho que apresentavam igualmente uma semelhança superior a 90% considerando-se idênticas.

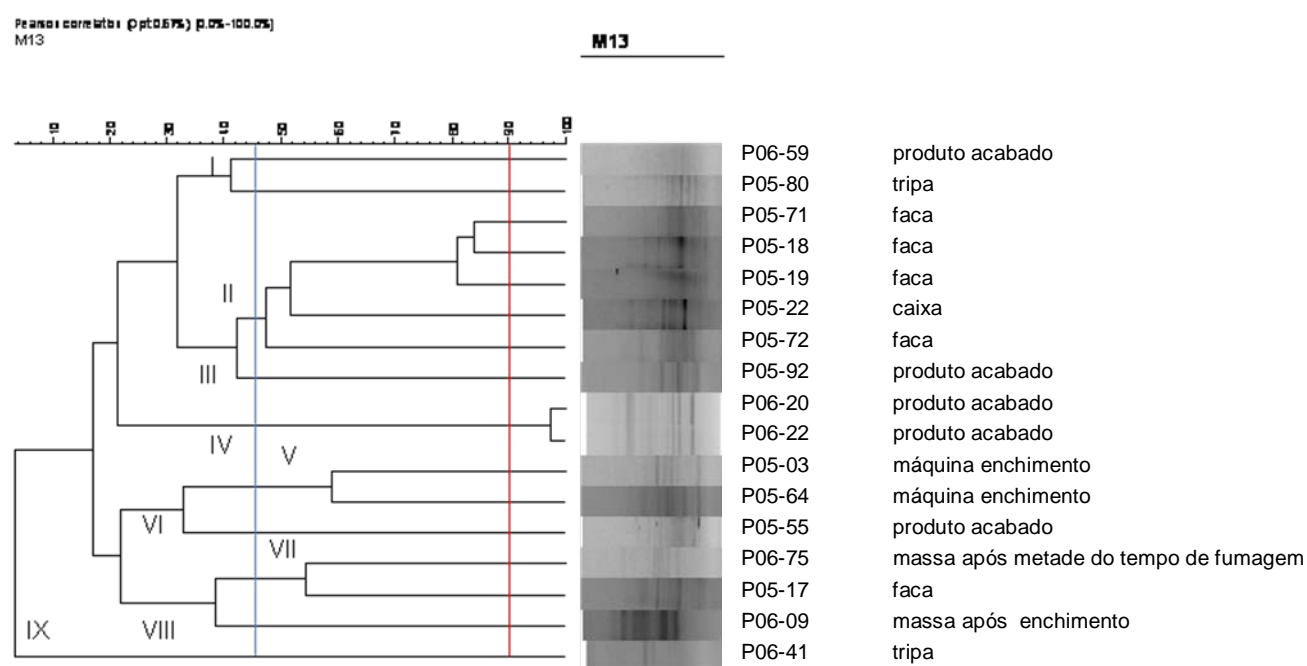
Da análise do perfil genético das estirpes de *Staphylococcus* spp *em estudo* (Figura 14) estabeleceram-se nove grupos cujas semelhanças eram inferior a 45%: I) P05-59, P05-80; II) P05-71, P05-18, P05-19, P05-22, P05-72; III) P05-92; IV) P06-20, P06-22; V) P05-03, P05-64; VI) P05-55; VII) P06-75, P05-17; VIII) P06-09; IX) P06-41.

Apenas as estirpes P06-20 e P06-22 apresentavam uma semelhança superior a 90% podendo ser consideradas idênticas.

As estirpes de *Staphylococcus* não identificadas quanto à espécie e, isoladas na Unidade Fabril B foram colhidas maioritariamente no produto acabado ou na massa enquanto as estirpes isoladas da Unidade Fabril A foram colhidas predominantemente nas superfícies como facas e caixas.

De salientar que estamos perante um género que poderá conter 41 espécies e 21 subespécies diferentes.

Figura 14– Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus* spp obtido por PCR *Fingerprinting* (A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de *clusters*)



3.4. Comparação entre os resultados obtidos por identificação fenotípica e genotípica de isolados de *Staphylococcus*

Os resultados da identificação fenotípica foram extraídos do estudo efectuado por Fraqueza *et al.* (2006).

Na Tabela 9 sumariza-se a relação entre a identificação fenotípica e genotípica encontrada para os isolados em estudo. Dos quarenta e um (41) isolados identificados bioquimicamente como *Staphylococcus xylosus* apenas 24 foram confirmadas. Dos restantes, onze (11) foram identificados como *Staphylococcus equorum*, dois (2) como *Staphylococcus carnosus*, um (1) como *Staphylococcus epidermidis*, um (1) como *Staphylococcus saprophyticus*, um (1) como *Staphylococcus* spp e outro não foi identificado como *Staphylococcus*.

Dos trinta e cinco (35) isolados considerados fenotipicamente como: excluídos, “não identificados” ou *Micrococcus* spp, oito (8) foram identificados como *Staphylococcus* spp, sete (7) identificados genotipicamente como *Staphylococcus equorum*, seis (6) como *Staphylococcus xylosus*, cinco (5) como *Staphylococcus carnosus*, quatro (4) como *Staphylococcus saprophyticus* e cinco (5) identificados genotipicamente como *Staphylococcus epidermidis*.

Dos doze isolados (12) identificados bioquimicamente como *Staphylococcus sciuri*, nove (9) foram identificados genotipicamente como *Staphylococcus equorum*, dois (2) como *Staphylococcus* spp e um (1) como *Staphylococcus xylosus*.

Dos oito (8) isolados identificados fenotipicamente como *Staphylococcus saprophyticus*, cinco foram confirmados genotipicamente como *S. saprophyticus* e, para os três restantes não foi identificada a espécie.

Dos sete (7) isolados identificados fenotipicamente como *Staphylococcus carnosus* apenas cinco (5) foi confirmado genotipicamente pelo método PCR utilizado. Dos restantes, um foi identificado genotipicamente como *Staphylococcus xylosus* e o outro foi identificado como *Staphylococcus* spp.

Um (1) isolado identificado fenotipicamente como *Staphylococcus hominis* foi identificado genotipicamente concluindo-se que pertencia ao género *Staphylococcus*.

Tabela 9 – Comparação entre a identificação fenotípica e a identificação genotípica dos isolados em estudo

Espécie	Identificação genotípica								
		<i>S. xylosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. Género</i>	N.I.D	Total
		(%)							
Identificação fenotípica	<i>S. xylosus</i> n= 41	60	2	5	27	2	2	2	100
	<i>S. epidermidis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>S. equorum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>S. carnosus</i> (n = 7)	14	—	72	—	—	14	—	100
	<i>S. saprophyticus</i> (n = 8)	—	—	—	—	62	38	—	100
	<i>S. hominis</i> (n = 1)	—	—	—	—	—	100	—	100
	<i>S. sciuri</i> (n = 12)	8	—	—	75	—	17	—	100
	“NID”, Excluído, <i>Micrococcus</i> spp (n = 35)	17	14	14	20	12	23	—	100

NID – Não identificado

3.5. Provas de interesse tecnológico

Dos dendogramas por espécie apresentados no ponto 3.3 foram seleccionados para as provas de interesse tecnológico, de preferência um ou dois (no caso de haver estirpes com perfis genéticos muito diferentes) representantes de cada cluster. Assim, para o caso do *Staphylococcus carnosus* foram seleccionadas as seguintes estirpes: P06-104 e P06-14 (grupo I), P06-84 (grupo II) e P05-58 (grupo III) retiradas da massa após enchimento, produto acabado ou ingrediente (alho). Para o caso do *Staphylococcus saprophyticus* foram seleccionadas: P05-

95 e P05-97 (grupo I), P05-28 e P06-02 (grupo II), P05-16 e P05-68 (grupo III) retiradas não só do produto acabado e ingredientes (alho) como das superfícies de trabalho (faca e mesa). Relativamente ao *Staphylococcus epidermidis* foram seleccionadas as estirpes P06-40 (grupo I), P06-44 (grupo II), P06-89 e P05-91 (Grupo III) e P06-73 (grupo IV) cujas amostras foram colhidas nas diferentes fases do processo de fabrico, tripa e superfícies de trabalho (picadora). No que se refere ao *Staphylococcus xylosus* foram seleccionados as seguintes estirpes: P06-29 e P06-47 (grupo I), P06-95 (grupo II), P06-01, P06-26, P06-85 e P06-102 (grupo III), P06-97 (grupo IV), P06-17 (grupo V) e P06-78 (grupo VII) cujas amostras foram retiradas do produto e suas diversas fases de produção e ingredientes.

Do dendograma relativo ao *Staphylococcus equorum* foram seleccionadas as estirpes: P05-21 e P05-26 (grupo II), P05-02, P05-07 e P05-44 (grupo III), P05-74 (grupo IV); P05-13 (grupo V) e P05-15 (grupo VI) colhidas preferencialmente das superfícies de trabalho (caixa, máquina de enchimento, mesa, câmara de refrigeração e faca) e massa após enchimento.

Por último e, relativamente às estirpes de *Staphylococcus* spp (dendograma *Staphylococcus* spp) foram seleccionadas as seguintes estirpes: P06-59 (grupo I), P05-22, P05-72 (grupo II), P06-20, P06-22 (grupo IV); P05-03 e P05-64 (grupo V), P05-55 (grupo VI); P06-75 (grupo VII) e P06-09 (grupo VIII).

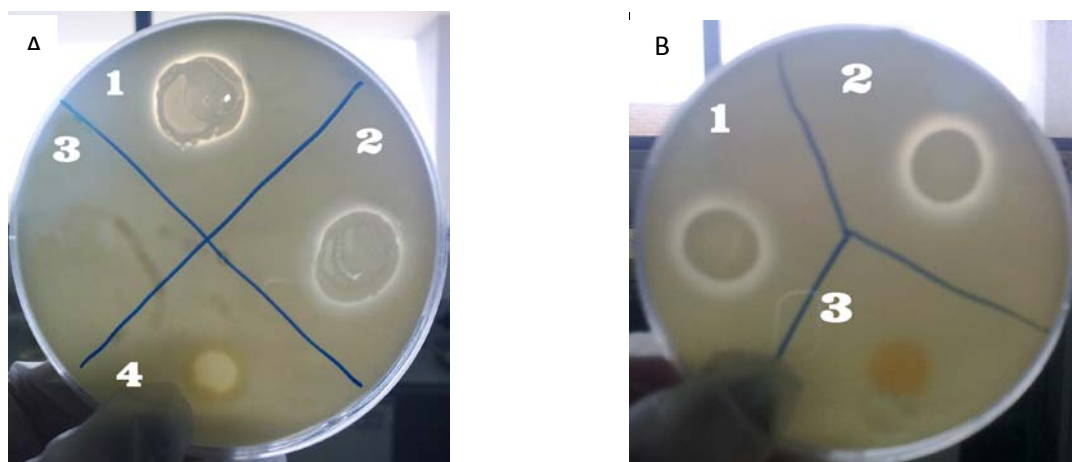
Para além das estirpes indicadas anteriormente foram submetidas às provas de interesse tecnológico, os padrões das estirpes estudadas.

3.5.1. Actividade proteolítica

Na Figura 15 apresenta-se a actividade proteolítica de estirpes seleccionadas para determinação do seu interesse tecnológico. Assim, na Figura 15A pode-se constatar que as estirpes (1), (2) e (4) identificadas genotipicamente como *S. equorum* apresentavam diferentes actividades proteolíticas uma vez que as estirpes (1) e (2) evidenciavam a existência de halo transparente à volta da colónia e a (4) não o apresentava. A estirpe (3) identificada genotipicamente com *S. carnosus* não apresentava actividade proteolítica (sem halo transparente).

Na Figura 15 B é apresentada a actividade proteolítica de três estirpes padrão: (1) *S. equorum* (DSMZ 20029) após um período de incubação de 96 horas, (2) *S. aureus* (ATTC 29213), ambas evidenciando actividade proteolítica, e a estirpe padrão *S. xylosus* (ATTC 8166) (3) sem evidência de actividade proteolítica.

Figura 15 – Exemplo de estirpes de *Staphylococcus* em estudo (A) e de referência (B) com e sem actividade proteolítica no meio de cultura



A): (1) P05-74; (2) P06-15; (3) P06-22; (4) P06-21
 B): (1) *S. equorum* (DSMZ 20029) 96 h incubação; (2) *S. aureus* (ATTC 29213); (3) *S. xylosus* (ATTC 8166)

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos na determinação da actividade proteolítica das estirpes em estudo. Foram classificadas como positivas (+) apresentando-se neste caso a largura do halo transparente formado, em mm e negativas (neg) no caso de ausência de halo.

Tabela 10 – Actividade proteolítica apresentada pelas estirpes de *Staphylococcus* em estudo

Unidade fabril	Codificação da estirpe	Origem da estirpe	Identificação genética	Actividade proteolítica
B	01	alho	<i>Staphylococcus xylosus</i>	neg
	17	produto acabado		neg
	26	produto acabado		+ (5 mm)
	29	produto acabado		+ (4 mm)
	47	massa após enchimento		+ (1 mm)
	78	massa após enchimento		neg
	85	massa após enchimento		neg
	95	tripa		neg
	97	massa após enchimento		neg
	102	massa após enchimento		neg
_____	padrão	_____	<i>Staphylococcus. xylosus</i> ATTC 8166	+ (2 mm)

Unidade fabril	Codificação da estirpe	Origem da estirpe	Identificação genética	Actividade proteolítica
A	2	máquina de enchimento	<i>Staphylococcus equorum</i>	neg
	7	mesa		neg
	13	câmara de refrigeração		neg
	15	faca		+ (2 mm)
	21	caixa		+ (1 mm)
	26	caixa		neg
	44	massa após enchimento		neg
	74	caixa		+ (3mm)
_____	padrão	_____	<i>S. equorum subespécie equorum DSMZ 20029</i>	+ (2 mm)
B	14	alho	<i>Staphylococcus carnosus</i>	+ (2 mm)
B	84	massa após enchimento		neg
B	104	massa após enchimento		neg
A	58	produto acabado		+ (1 mm)
_____	padrão	_____	<i>S. carnosus subespécie carnosus DSMZ 4600</i>	+ (2 mm)
_____	padrão	_____	<i>S. carnosus subespécie carnosus CECT 4491</i>	neg
B	2	alho	<i>S. saprophyticus</i>	neg
A	16	faca		neg
	28	faca		neg
	68	mesa		neg
	95	produto acabado		neg
	97	produto acabado		neg
_____	padrão	_____	<i>S. saprophyticus subespécie bovis DSMZ 18669</i>	neg
B	40	tripa	<i>S. epidermidis</i>	neg
B	44	picadora		neg
B	73	massa após metade tempo fumagem		+ (3 mm)
B	89	picadora		+ (2 mm)
A	91	massa após metade tempo fumagem		neg
_____	padrão	_____	<i>S. epidermidis RP62A</i>	neg
_____	padrão	_____	<i>S. aureus ATTC29213</i>	+ (5 mm)
_____	padrão	_____	<i>S. simulans DSMZ 20323</i>	neg
B	09	massa após enchimento	<i>Staphylococcus spp</i>	+ (2 mm)
	20	produto acabado		neg
	22	produto acabado		neg
	59	produto acabado		+ (0,5 mm)
	75	massa após metade tempo fumagem		neg
A	03	maquina enchimento	<i>Staphylococcus spp</i>	neg
	22	caixa		neg
	55	produto acabado		neg
	64	máquina de enchimento		neg
	72	faca		+ (3 mm)

neg - negativo

As Tabelas 11 e 12 apresentam a distribuição de resultados expressos em percentagem da actividade proteolítica das estirpes seleccionadas das Unidades Fabris A e B.

Na Unidade Fabril A das vinte (20) estirpes de *staphylococcus* estudadas, cinco (25%) evidenciaram actividade proteolítica das quais três eram *S. equorum*, uma *S. carnosus* e uma sem identificação de espécie. Quinze (75%) das vinte estirpes estudadas não apresentavam actividade proteolítica encontrando-se distribuídas da seguinte forma: cinco eram *S. equorum*, cinco eram *S. saprophyticus*, uma era *S. epidermidis* e quatro não tinham espécie identificada. Na Unidade Fabril B das vinte e três estirpes de *Staphylococcus* estudadas, oito (35%) evidenciaram actividade proteolítica das quais, três eram *S. xylosus*, duas *S. epidermidis*, uma *S. carnosus* e, duas não tinham sido identificadas quanto à espécie, Quinze (65%) das vinte e três estirpes de *Staphylococcus* estudadas não apresentavam actividade proteolítica encontrando-se distribuídas da seguinte forma: sete eram *S. xylosus*, duas *S. carnosus*, duas *S. epidermidis*, uma *S. saprophyticus* e três não tinham sido identificadas na espécie.

Tabela 11 – Apresentação de resultados (%) da actividade proteolítica de estirpes de *Staphylococcus* de diferentes espécies, na Unidade Fabril A

Actividade proteolítica	<i>S. equorum</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. género</i>	Total
Unidade Fabril A (%)							
Positivo (n=5)	15	–	–	5	–	5	25
Negativo (n= 15)	25	–	25	–	5	20	75

Tabela 12 – Apresentação de resultados (%) da actividade proteolítica de estirpes de *Staphylococcus* de diferentes espécies, na Unidade Fabril B

Actividade proteolítica	<i>S. equorum</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. género</i>	Total
Unidade Fabril B (%)							
Positivo (n=8)	-	13	-	4	9	9	35
Negativo (n= 15)	-	30	4	9	9	13	65

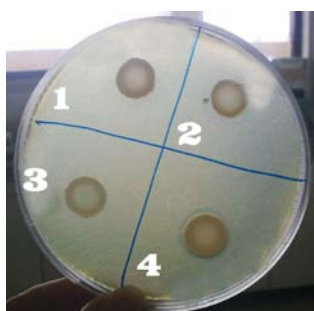
3.5.2. Actividade lipolítica

Na Figura 16 é apresentada a actividade lipolítica de algumas estirpes seleccionadas para sua avaliação e interesse tecnológico. Assim, na Figura 16A) pode-se constatar que as estirpes (1) e (2) identificadas genotipicamente como *S. saprophyticus* e (3) identificada genotipicamente como *Staphylococcus* spp não apresentavam actividade lipolítica enquanto a estirpe (4) identificada como *Staphylococcus xylosus* apresentava um halo à volta da colónia evidenciando assim actividade lipolítica.

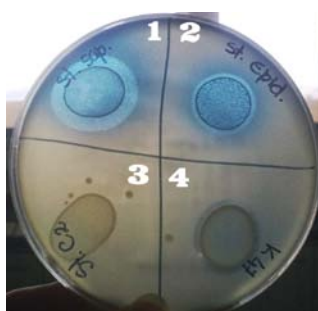
Na Figura 16B) apresenta-se a actividade lipolítica de três estirpes padrão: (1) *S. saprophyticus* (DSMZ 18669), (2) *S. epidermidis* (RP62A) ambas evidenciando actividade lipolítica e a estirpe padrão *S. carnosus* subespécie *carnosus* (CECT 4491) (3) sem evidência de actividade lipolítica. A estirpe (4) genotipicamente identificada como *S. xylosus* apresentava actividade lipolítica.

Na Figura 16C) pode observar-se a actividade lipolítica de duas estirpes padrão: (1) *S. carnosus* subespécie *carnosus* (CECT 4491), (2) *S. carnosus* subespécie *carnosus* (DSMZ 4600) em que a primeira não evidenciava actividade lipolítica contrariamente à segunda. As estirpes (3) e (4) identificadas genotipicamente como *S. equorum* e *S. epidermidis* respectivamente não evidenciavam actividade lipolítica.

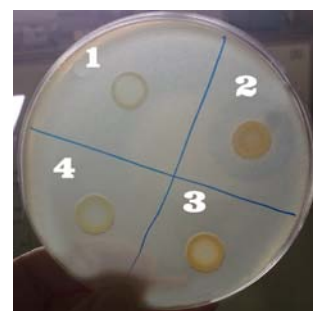
Figura 16 – Exemplo de estirpes de *Staphylococcus* em estudo (A) e estirpes de referência (B e C) com e sem actividade lipolítica



A): (1) P05-28; (2) P05-97; (3) P05-72 (4) P06-97



B): (1) *S. saprophyticus* (DSMZ 18669), (2) *S. epidermidis* (RP62A) (3) *S. carnosus* (CECT4491); (4) P06-47



C): (1) *S. carnosus* (CECT4491); (2) *S. carnosus* (DSMZ 4600); (3) P06-89; (4) P05-74

A Tabela 13 resume os resultados obtidos na determinação da actividade lipolítica das estirpes em estudo. Foram classificadas como positivas (+) apresentando-se neste caso a largura do halo formado, em mm e negativas (neg) no caso de ausência de halo.

Tabela 13 - Actividade lipolítica apresentada pelas estirpes de *Staphylococcus* em estudo

Unidade fabril	Codificação da estirpe	Origem da estirpe	Identificação genética	Actividade lipolítica
B	01	alho	<i>Staphylococcus xylosus</i>	+ (1 mm)
	17	produto acabado		+ (1 mm)
	26	produto acabado		+ (0,5 mm)
	29	produto acabado		+ (1 mm)
	47	massa após enchimento		+ (1 mm)
	78	massa após enchimento		+ (2 mm)
	85	massa após enchimento		+ (1,5 mm)
	95	tripa		+ (0,5 mm)
	97	massa após enchimento		+ (1 mm)
	102	massa após enchimento		+ (1,5 mm)
_____	padrão	_____	<i>S. xylosus</i> ATTC 8166	+ (2 mm)
A	2	máquina de enchimento	<i>Staphylococcus equorum</i>	neg
	7	mesa		neg
	13	câmara de refrigeração		neg
	15	faca		neg
	21	caixa		neg
	26	caixa		neg
	44	massa após enchimento		neg
	74	caixa		+ (3mm)
_____	padrão	_____	<i>S. equorum</i> subespécie <i>equorum</i> DSMZ 20029	+ (2 mm)
B	14	alho	<i>Staphylococcus carnosus</i>	neg
	84	massa após enchimento	<i>Staphylococcus carnosus</i>	neg
	104	massa após enchimento		neg
A	58	produto acabado		+ (1 mm)
_____	padrão	_____	<i>S. carnosus</i> subespécie <i>carnosus</i> DSMZ 4600	+ (5 mm)
_____	padrão	_____	<i>S. carnosus</i> subespécie <i>carnosus</i> CECT 4491	neg
B	2	alho	<i>S. saprophyticus</i>	neg
A	16	faca		neg
	28	faca		neg
	68	mesa		neg
	95	produto acabado		neg
	97	produto acabado		neg
_____	padrão	_____	<i>S. saprophyticus</i> subespécie <i>bovis</i> DSMZ 18669	+ (6 mm, azul)
B	40	tripa	<i>S. epidermidis</i>	neg
B	44	picadora		+ (1 mm)
B	73	massa após metade tempo fumagem		+ (3 mm, azul)
B	89	picadora		neg
A	91	massa após metade tempo fumagem		neg
_____	padrão	_____	<i>S. epidermidis</i> RP62A	+ (3mm, azul)
_____	padrão	_____	<i>S. aureus</i> ATTC29213	+ (3 mm)
_____	padrão	_____	<i>S. simulans</i> DSMZ 20323	+ (6 mm, azul)

Unidade fabril	Codificação da estirpe	Origem da estirpe	Identificação genética	Actividade lipolítica
B	09	massa após metade tempo fumagem	<i>Staphylococcus spp</i>	+ (1 mm)
	20	produto acabado		neg
	22	produto acabado		neg
	59	produto acabado		+ (1 mm)
	75	massa após metade tempo fumagem		+ (2mm, azul)
A	03	maquina enchimento	<i>Staphylococcus spp</i>	neg
	22	caixa		+ (6 mm)
	55	produto acabado		neg
	64	máquina de enchimento		neg
	72	faca		neg

neg - negativo

As Tabelas 14 e 15 apresentam a distribuição de resultados expressos em percentagem da actividade lipolitica das estirpes seleccionadas nas Unidades Fabris A e B de forma a identificar as que possuem interesse tecnológico.

Na Unidade Fabril A (Tabela 14) das vinte (20) estirpes de *Staphylococcus* estudadas, três (15%) evidenciaram actividade lipolítica distribuídas igualmente por *S. equorum*, *S. carnosus* e uma sem identificação de espécie. Dezassete (85%) das vinte estirpes estudadas não apresentavam actividade lipolítica encontrando-se distribuídas da seguinte forma: sete eram *S. equorum*, cinco eram *S. saprophyticus*, uma era *S. epidermidis* e quatro não foram identificados em relação a espécie.

Tabela 14 – Avaliação da actividade lipolítica de estirpes de *Staphylococcus*, por espécie (%), na Unidade Fabril A

Actividade lipolítica	<i>S. equorum</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. género</i>	Total
Unidade Fabril A (%)							
Positivo (n= 3)	5	—	—	5	—	5	15
Negativo (n= 17)	35	—	25	—	5	20	85

Na Unidade Fabril B (Tabela 15) das vinte e três (23) estirpes de *Staphylococcus* estudadas, 15 (65%) evidenciaram actividade lipolítica das quais, dez eram *S. xylosus*, duas eram

S. epidermitis e três não tinham espécie identificada. Oito (35%) das vinte e três estirpes estudadas não apresentavam actividade lipolítica encontrando-se distribuídas da seguinte forma: três eram *S. carnosus*, duas eram *S. epidermidis* e uma era *S. saprophyticus*. As duas restantes não tinham espécie identificada.

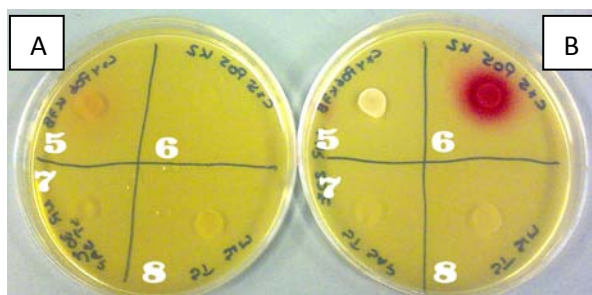
Tabela 15 – Apresentação de resultados (%) da actividade lipolítica, por espécie, na Unidade Fabril B

Actividade lipolítica	<i>S. equorum</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. género</i>	Total
Unidade Fabril B (%)							
Positivo (n= 15)	-	43	—	—	9	13	65
Negativo (n= 8)	-	—	4	13	9	9	35

3.5.3. Actividade nitrato redutase

Na Figura 17 são apresentadas como exemplo as estirpes P06-78; (6) P05-02 (7) *S. saprophyticus* (DSMZ18669); (8) *S. simulans* (DSMZ 20323) com e sem actividade nitrato redutase ao fim de 7 horas a 30°C (A) e ao fim de 24 horas a 20°C (B). Assim, na Figura pode-se constatar que as estirpes (7) e (8) respectivamente *S. saprophyticus* (DSMZ 18669) e *S. simulans* (DSMZ 20323) não apresentavam actividade nitrato redutase às 7 e 24 horas. A estirpe (P06-78) identificada genotipicamente como *S. xylosus* evidenciava uma ligeira actividade nitrato redutase às 7 horas e, sem actividade às 24 horas enquanto, a estirpe (P05-02) identificada genotipicamente como *S. equorum* não apresentava actividade nitrato redutase às 7 horas mas apresentava-a às 24 horas.

Figura 17 - Exemplo de estirpes de *Staphylococcus* em estudo a diferentes condições: 30°C/7 horas (A) e 20°C/24 horas (B)



Legenda: (5) P06-78; (6) P05-02 (7) *S. saprophyticus* (DSMZ18669); (8) *S. simulans* (DSMZ 20323)

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos na determinação da actividade nitrato redutase das estirpes em estudo. Foram classificadas como positivas (+) apresentando-se neste caso a largura do halo formado (em mm) e a intensidade da coloração (em cruces) e, negativas (neg) no caso de ausência de halo.

Tabela 16 - Actividade nitrato redutase apresentada pelas estirpes de *Staphylococcus* em estudo

Unidade fabril	Codificação da estirpe	Origem da estirpe	Identificação genética	30°C	20°C	15°C		
				7 h	24 h	72 h		
B	01	alho	Staphylococcus xylosus	4 mm +++	4 mm +++	0,5 ++		
	17	produto acabado		5 mm +++	4 mm +++	neg		
	26	produto acabado		neg	neg	neg		
	29	produto acabado		neg	neg	neg		
	47	massa após enchimento		neg	neg	neg		
	78	massa após enchimento		Lig +	neg	neg		
	85	massa após enchimento		neg	9 mm +++	neg		
	95	tripa		2 mm +	7 mm ++++	5 mm ++		
	97	massa após enchimento		neg	Lig +	neg		
	102	massa apósenchimento		5 mm +++	3 mm +++	neg		
_____	padrão	_____	St xylosus ATTC 8166	neg	1 mm +	neg		
A	2	máquina de enchimento	Staphylococcus equorum	neg	3 mm ++	10 mm +++++		
	7	mesa		neg	8 mm +++	9 mm +++++		
	13	câmara de refrigeração		neg	neg	neg		
	15	faca		neg	1 mm ±	6 mm +++++		
	21	caixa		neg	7 mm +++	9 mm +++++		
	26	caixa		neg	3 mm ++++	14 mm +++++		
	44	massa após enchimento		neg	2 mm +++	15 mm ++++		
	74	caixa		neg	2 mm +++	12 mm +++		
	_____	padrão		_____	S. equorum subespécie equorum DSMZ 20029	3 mm ++	neg	neg
	B	14		alho	Staphylococcus carnosus	2 mm +	neg	neg
84		massa após enchimento	neg	neg		neg		
104		massa após enchimento	neg	neg		neg		
A	58	produto acabado	S. carnosus subespécie carnosus DSMZ 4600 S. carnosus subespécie carnosus CECT 4491	neg	neg	4 mm +++		
_____	padrão	_____		0,5 mm +	neg	neg		
_____	padrão	_____		1,0 mm +	7 mm ++++	neg		
B	2	alho	S. saprophyticus	neg	neg	neg		

Unidade fabril	Codificação da estirpe	Origem da estirpe	Identificação genética	30°C 7 h	20°C 24 h	15°C 72 h
A	16	faca	<i>S. saprophyticus</i>	neg	neg	neg
	28	faca		neg	neg	2 mm +
	68	mesa		neg	neg	12 mm ++
	95	produto acabado		2 mm +	7 mm ++++	neg
	97	produto acabado		neg	neg	neg
	padrão	_____	<i>S. saprophyticus</i> subespécie <i>bovis</i> DSMZ 18669	neg	neg	Neg
B	40	tripa	<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	neg
B	44	picadora		3 mm ++	15 mm	11 mm +++
B	73	massa após metade tempo fumagem		neg	neg	neg
B	89	picadora		neg	neg	10 mm ++
A	91	massa após enchimento	<i>S. epidermidis</i> RP62A	neg	neg	neg
_____	padrão	_____		neg	neg	neg
_____	padrão	_____	<i>S. aureus</i> ATTC29213	6 mm ++++	12 mm +++	neg
_____	padrão	_____	<i>S. simulans</i> DSMZ 20323	neg	neg	neg
B	09	massa após enchimento	<i>Staphylococcus spp</i>	4 mm ++	1 mm +	neg
	20	produto acabado		2 mm +	neg	neg
	22	produto acabado		2 mm +	neg	neg
	59	produto acabado		neg	6 mm +++	9 mm +++
	75			neg	neg	neg
A	03	maquina enchimento	<i>Staphylococcus spp</i>	neg	3 mm ++	13 mm +++++
	22	caixa		neg	neg	neg
	55	produto acabado		neg	neg	8 mm +++++
	64	Máquina de enchimento		neg	neg	neg
	72	faca		neg	+ lig	3 mm ++

+ lig – ligeiro; neg – negativo

As Tabelas 17 e 18 apresentam a distribuição de resultados expressos em percentagem da actividade nitrato redutase a 30°C, 20°C e 15°C das estirpes seleccionadas das Unidades Fabris A e B para determinação do seu interesse tecnológico.

Na Unidade Fabril A (Tabela 17) a estirpe dominante (*S. equorum*) apresentava um comportamento distinto entre a temperatura de 30°C e as temperaturas de 20°C e 15°C. Assim

à primeira temperatura, as oito estirpes estudadas não evidenciavam actividade nitrato redutase enquanto para as outras temperaturas o comportamento era idêntico apresentando, sete delas, esta característica.

Relativamente às outras estirpes estudadas constatou-se que o nº de estirpes com actividade nitrato redutase era, em número inferior às que não apresentavam esta propriedade independentemente da temperatura.

Tabela 17 – Apresentação de resultados (%) da actividade nitrato redutase às diferentes temperaturas e por espécie, na Unidade Fabril A

Actividade nitrato redutase	<i>S. equorum</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. género</i>	Total
Unidade Fabril A (%)							
Positivo (n=1) 30°C	-	-	100	-	-	-	100
Positivo (n=10) 20°C	70	-	10	-	-	20	100
Positivo (n=13) 15°C	54	-	15	8	-	23	100
Negativo (n= 19) 30°C	42	-	22	5	5	26	100
Negativo (n= 10) 20°C	10	-	40	10	10	30	100
Negativo (n= 7) 15°C	14	-	43	-	14	29	100

Na Unidade Fabril B (Tabela 18) a estirpe dominante (*S. xylosus*) apresentava diferentes comportamentos a 30°C, 20°C e 15°C, assim: à primeira temperatura o nº de estirpes positivas igualava o nº de estirpes negativas (n=5) enquanto à temperatura de 20°C era maior o nº de estirpes actividade nitrato redutase positiva (n=6) do que negativas (n=4). À última temperatura (30°C) o nº de estirpes positivo (n=2) diminuiu fortemente.

Relativamente às outras estirpes estudadas verificou-se um maior nº de casos actividade nitrato redutase negativo do que positivo independentemente da temperatura.

Tabela 18– Avaliação da actividade nitrato redutase de estirpes de *Staphylococcus* em estudo da Unidade Fabril B às diferentes temperaturas e por espécie

Actividade nitrato redutase	<i>S. equorum</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. género</i>	Total
Unidade Fabril B (%)							
Positivo (n=10) 30°C	-	50	-	10	10	30	100
Positivo (n=9) 20°C	-	67	-	-	11	22	100
Positivo (n=5) 15°C	-	40	-	-	40	20	80
Negativo (n= 13) 30°C	-	22	4	8	13	8	55
Negativo (n= 14) 20°C	-	30	7	21	21	21	100
Negativo (n= 18) 15°C	-	44	6	17	11	22	100

A Tabela 19 apresenta a evolução da actividade nitrato redutase, actividade proteolítica e lipolítica em diferentes fases de crescimento das estirpes de *Staphylococcus* em estudo por turbidimetria em caldo de cultura YTA com medições da densidade óptica ao longo do tempo.

Tabela 19 - Evolução da actividade proteolítica, lipolítica e nitrato redutase com diferentes valores de densidade óptica

Amostra	Tempo (h)	Densidade Óptica	Act. Nitrato redutase			Act. Lipolítica	Act. Proteolítica
			30°C/7 h	20°C/24 h	15°C/72 h		
P05-15 <i>S. equorum</i>	48	0,473	neg	+ lig	16 mm +	neg	2 mm
	72	0,497	neg	neg	neg	neg	3 mm
	96	0,711	neg	+lig	+ lig	neg	1 mm
P05-21 <i>S. equorum</i>	48	0,460	neg	+lig	10 mm +	neg	1 mm
	72	0,500	neg	neg	5 mm +	neg	1,5 mm
	96	0,838	neg	+lig	+lig	neg	1 mm

Amostra	Tempo (h)	Densidade Óptica	Act. Nitrato redutase			Act. Lipolítica	Act. Proteolítica
			30°C/7 h	20°C/24 h	15°C/72 h		
P05-55 <i>S. carnosus</i>	48	0,349	neg	neg	neg	neg	neg
	72	0,361	neg	neg	neg	neg	neg
	96	0,601	+lig	neg	neg	neg	neg
P05-58 <i>S. carnosus</i>	48	0,359	neg	neg	neg	neg	neg
	72	0,481	+lig	neg	5 mm ±	neg	neg
	96	1,603	5 mm +++	neg	neg	neg	Neg
P05-72 <i>Stap. spp</i>	48	0,480	+ lig	0,7 mm ±	8 mm +	neg	2,5 mm
	72	0,571	neg	neg	+lig	neg	1 mm
	96	0,936	neg	neg	neg	neg	2 mm
P05-74 <i>S. equorum</i>	48	0,262	neg	+lig	neg	neg	neg
	72	0,540	neg	neg	neg	neg	neg
	96	1,213	neg	neg	neg	neg	1 mm
<i>S. aureus</i> ATTC29213	48	0,617	neg	neg	neg	neg	2,5 mm
	72	0,754	neg	neg	neg	neg	4 mm
	96	1,036	10 mm ++++	neg	neg	neg	3 mm
<i>S. equorum</i> DSMZ 20029	48	0,447	neg	+lig	neg	neg	1 mm
	72	0,594	neg	neg	neg	neg	2 mm
	96	1,177	3 mm ++	neg	neg	neg	3 mm

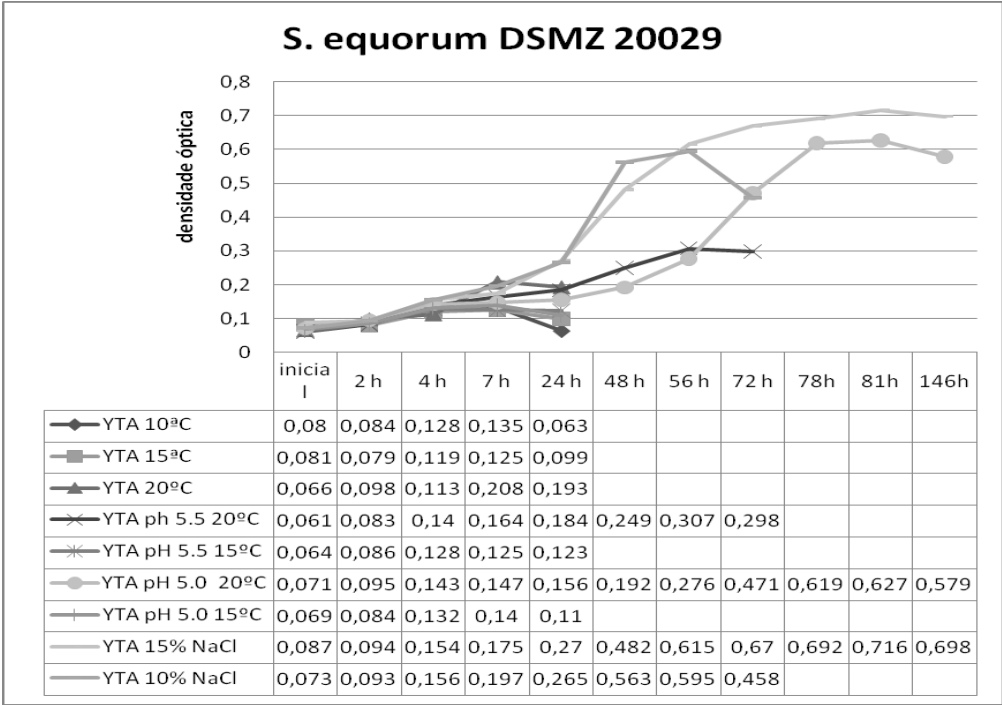
+ lig – ligeiro; neg – negativo

3.6 – Evolução do crescimento de estirpes de *Staphylococcus* sujeitas a diferentes condições de temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio

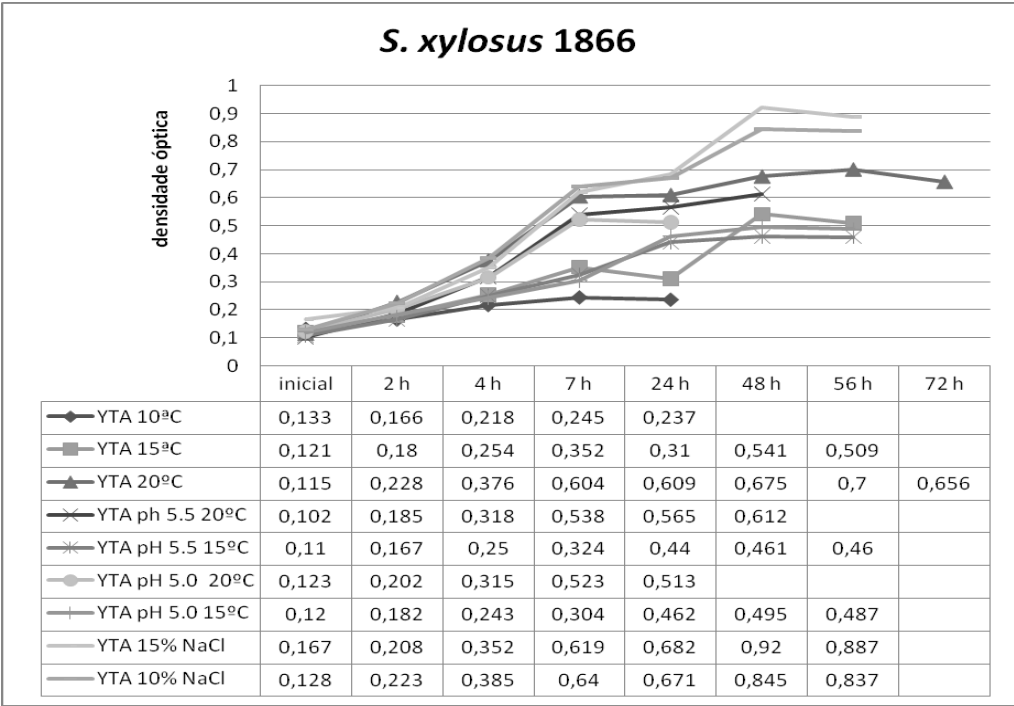
A Figura 18 apresenta a evolução do crescimento bacteriano, medido em densidade óptica a 625 nm, de estirpes padrão de *S. equorum* (DSMZ 20029) (Fig 18A), *S. xylosus* (ATTC 1866) (Fig 18B), *S. saprophyticus* subespécie *bovis* (RP62A) (Fig 18C), *S. simulans* (DSMZ 20323) (Fig 18D), *S. carnosus* subespécie *carnosus* (DSMZ 4600) (Fig 18E) e *S. carnosus* subespécie *carnosus* (CECT4491) (Fig 18F) em diferentes condições de temperatura, pH e concentrações de cloreto de sódio.

Figura 18 - Efeito da temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio nas estirpes padrão em estudo

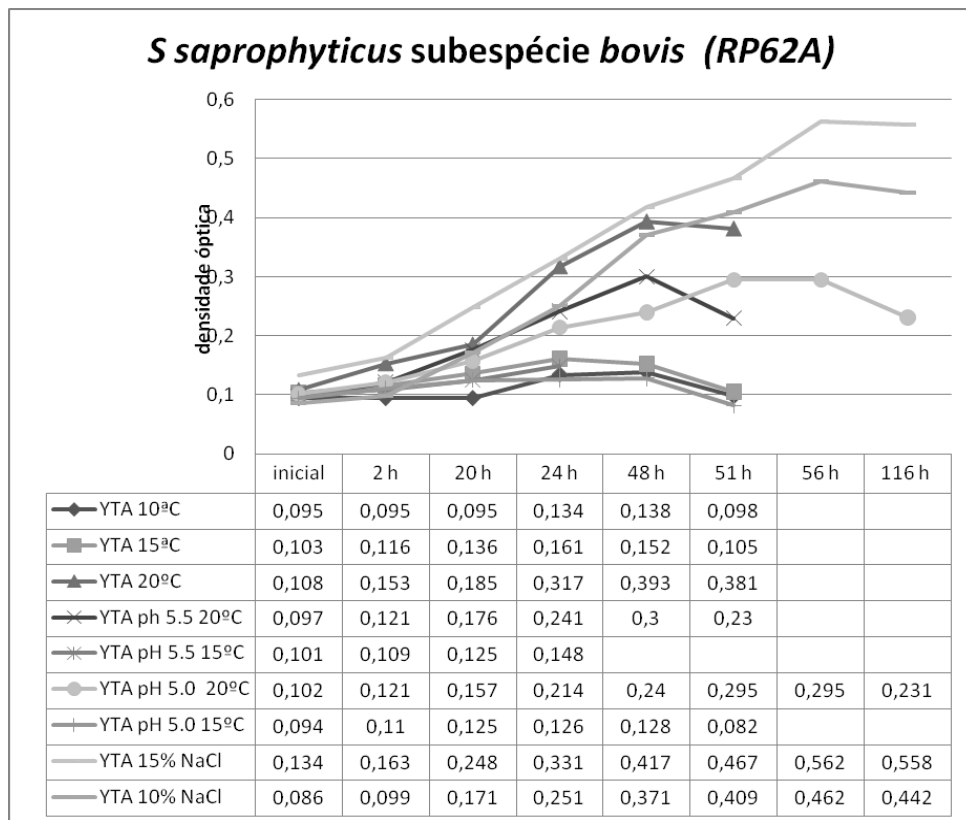
A)



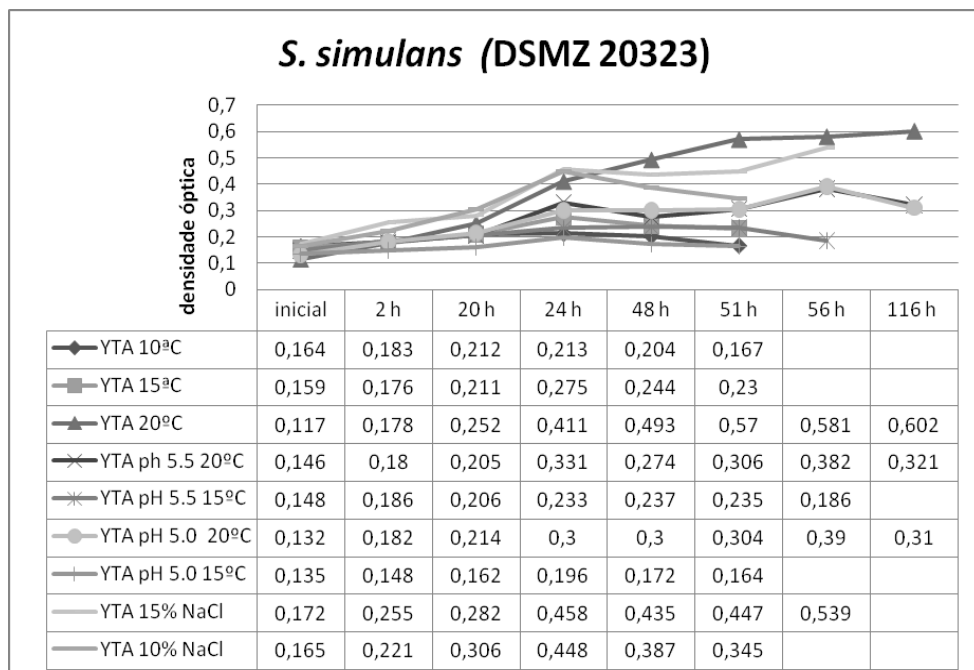
B)



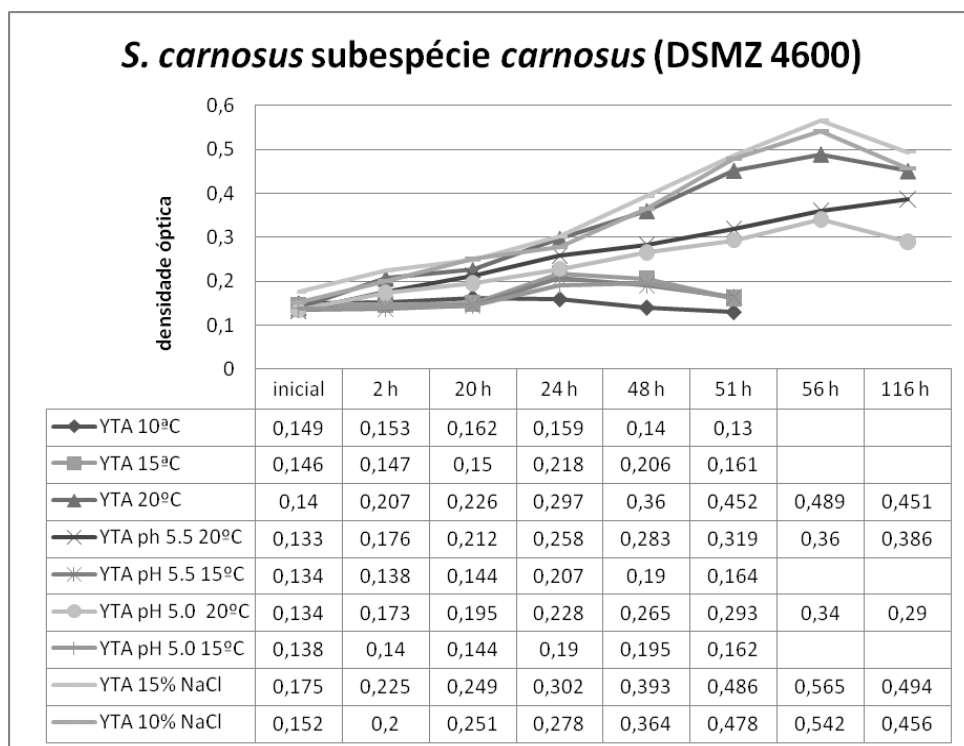
C)



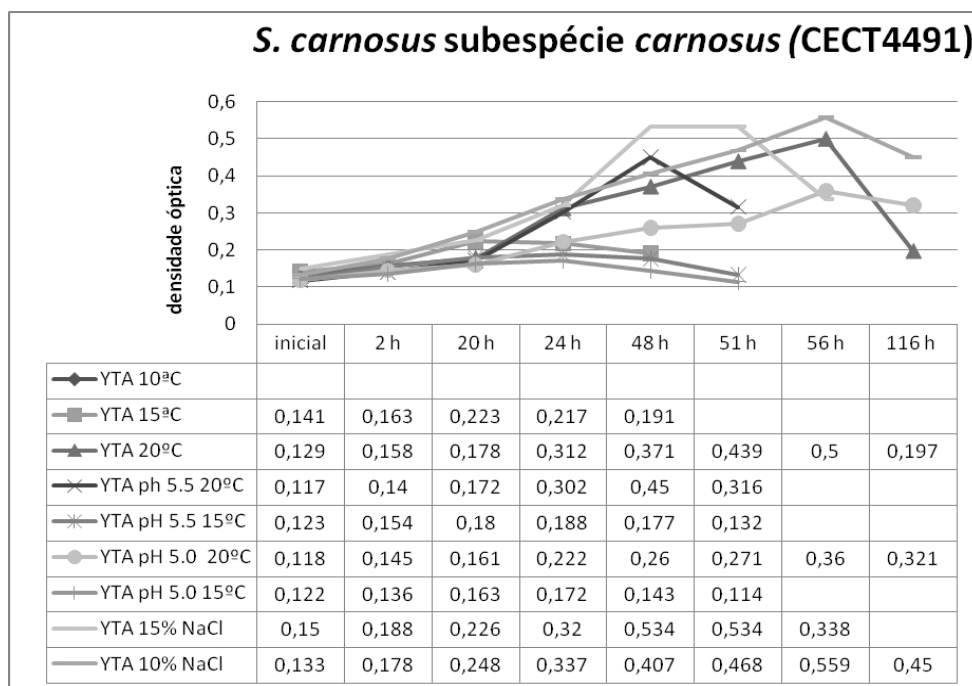
D)



E)



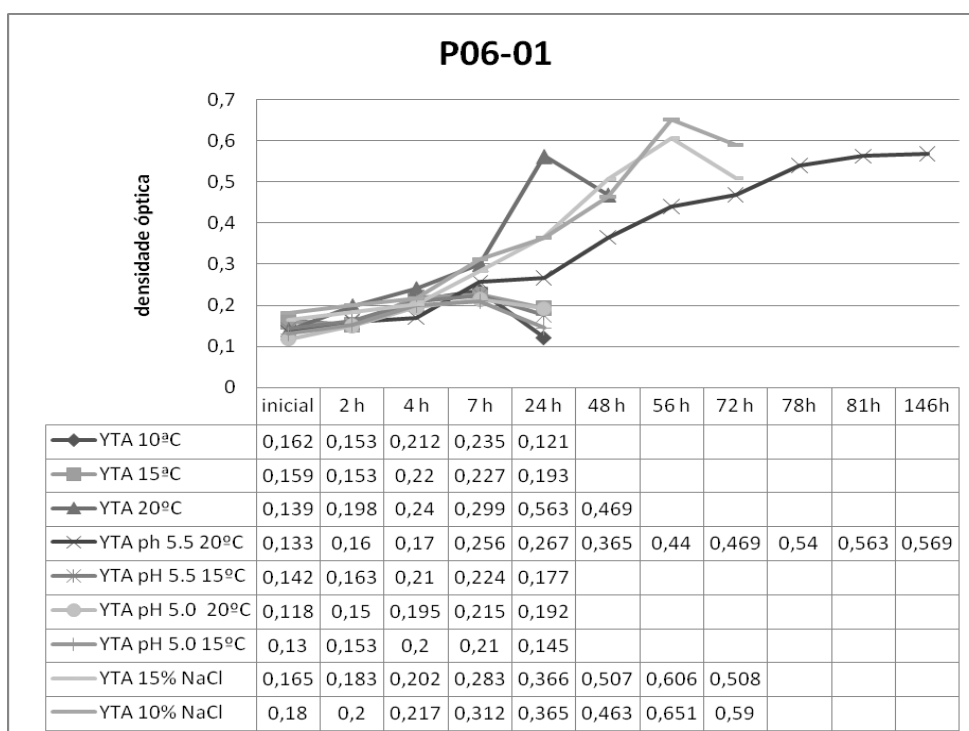
F)



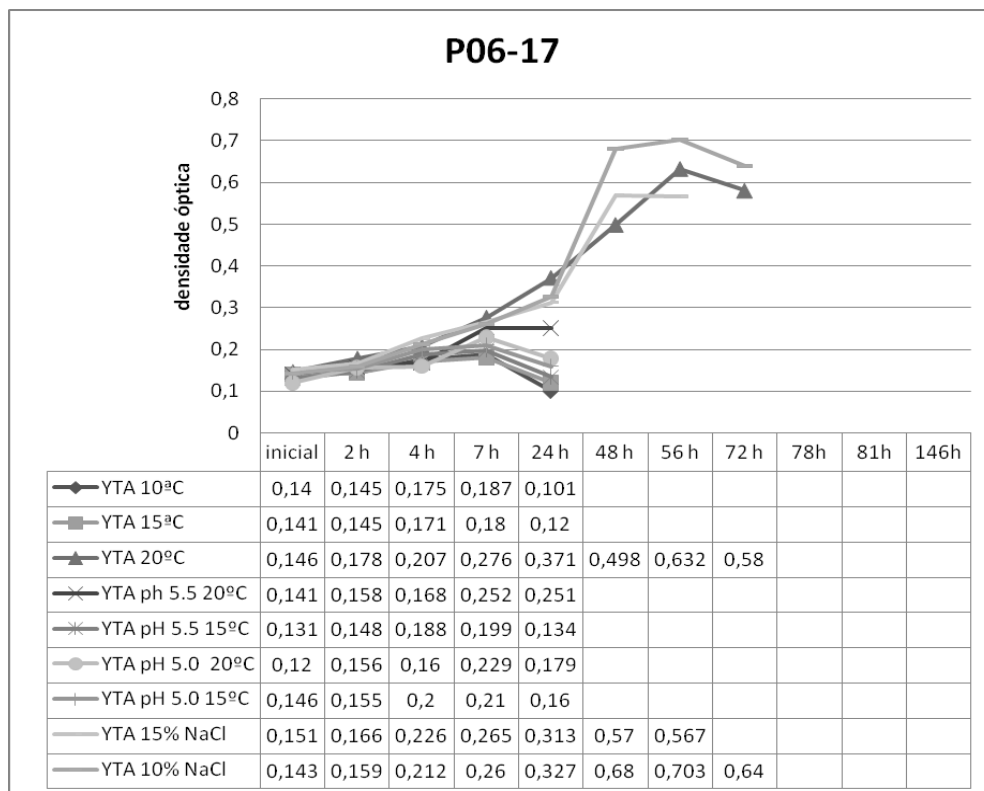
De, entre as estirpes seleccionadas anteriormente para avaliação quanto ao seu interesse tecnológico foram escolhidas aleatoriamente 6 estirpes de *Staphylococcus xylosus* (P06-01, P06-17, P06-78, P06-95, P06-97 e P06-102) apresentadas na Figura 19 e, quatro estirpes de *Staphylococcus equorum* (P05-02, P05-13, P05-26 e P05-74) para avaliação do seu crescimento em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio sendo os resultados apresentados na Figura 20.

Figura 19 - Efeito da temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio das estirpes de *Staphylococcus xylosus* seleccionadas (P06-01, P06-17, P06-78, P06-95, P06-97, P06-102)

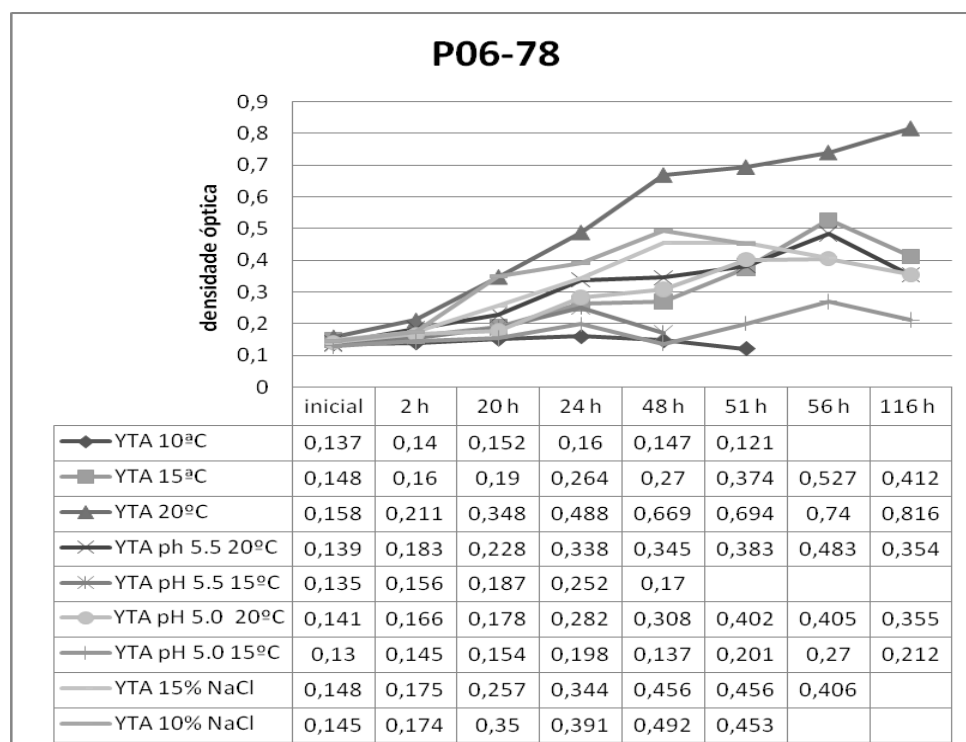
A)



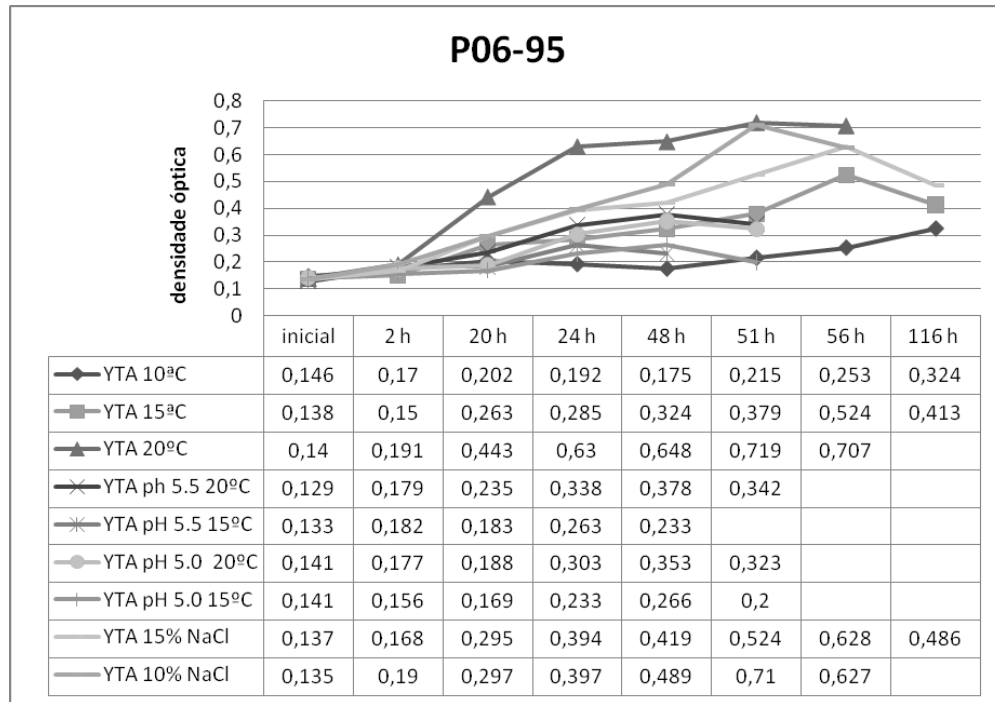
B)



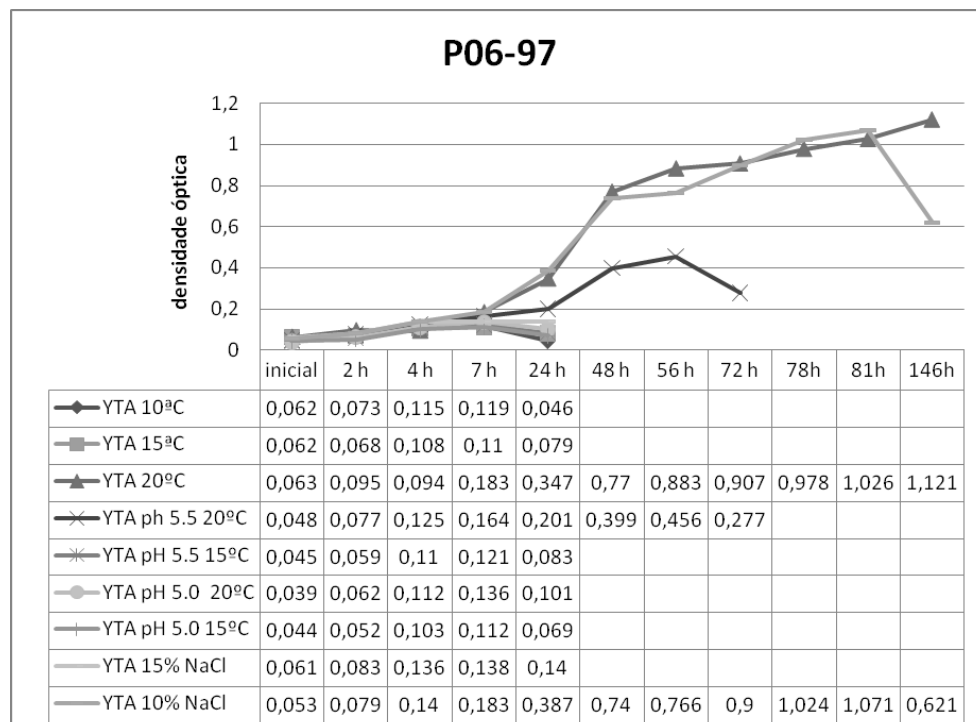
C)



D)



E)



F)

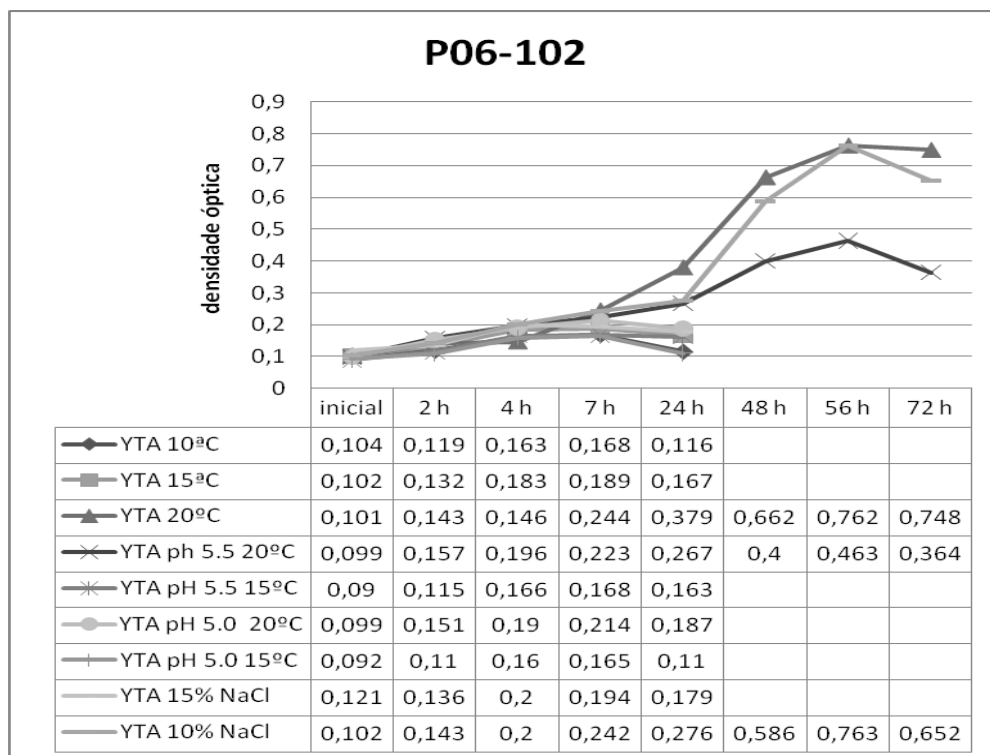
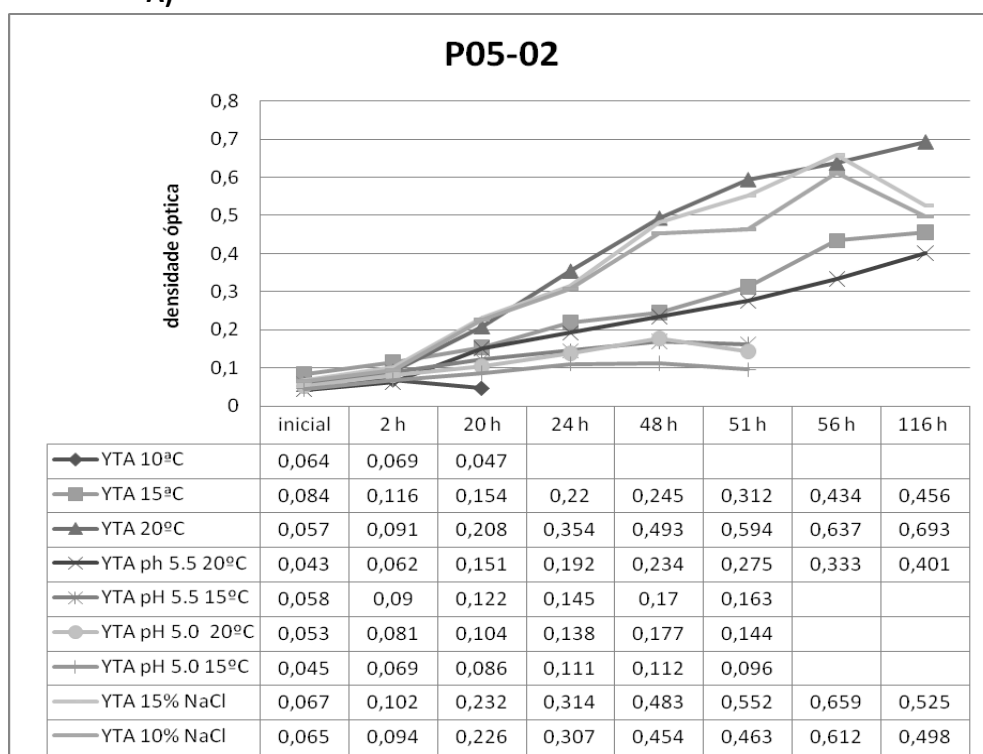
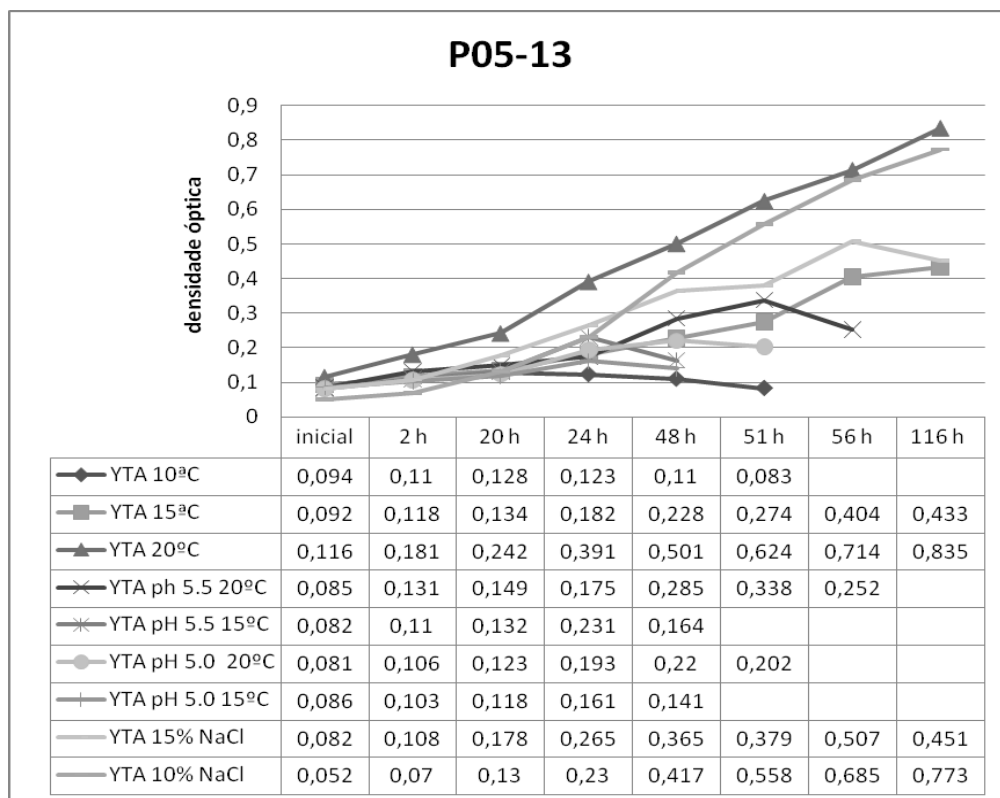


Figura 20- Efeito da temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio das estirpes de *Staphylococcus equorum* seleccionadas (P05-02, P05-13, P05-26, P05-74)

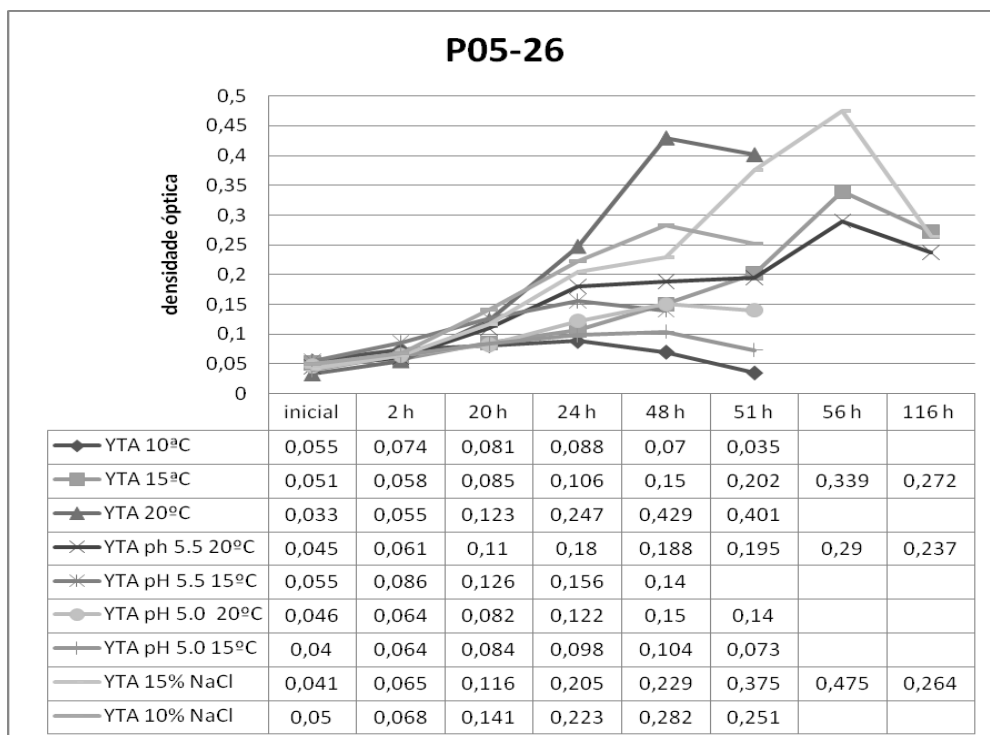
A)



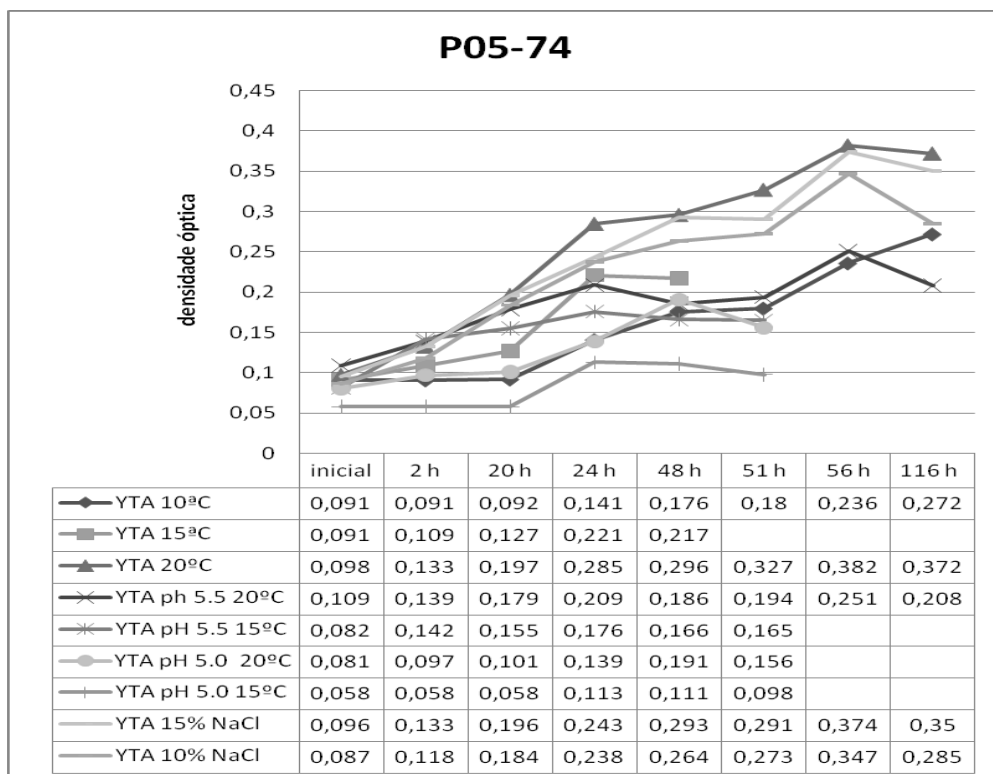
B)



C)



D)



3.6.1 – Efeito da temperatura

Estirpes padrão

Para o padrão *Staphylococcus equorum* (DSMZ 20029) (Figura 18A) foi evidenciado um decréscimo de crescimento a partir das 24 horas nas várias temperaturas estudadas.

Relativamente ao padrão *Staphylococcus xylosus* (ATTC 8166) (Figura 18B) observou-se um decréscimo na concentração a partir das 24 horas a 10°C quando para as restantes temperaturas (15°C e 20°C) estudadas esse decréscimo foi evidenciado a partir das 56 e 72 horas respectivamente.

Para o caso do *Staphylococcus saprophyticus* (DSMZ 18669) (Figura 18C) o decréscimo de crescimento para as várias temperaturas (10, 15 e 20°C) manifestou-se a partir das 51 horas.

A estirpe padrão *Staphylococcus simulans* (DSMZ 20029) (Figura 18D) evidenciou crescimento até às 48 horas para temperaturas de 10 e 15°C. A melhor adaptação da estirpe às condições testadas foi constatada para a temperatura de 20°C cujo crescimento ainda se manifestava ao fim de 4 dias (116 horas).

As duas estirpes padrão *Staphylococcus carnosus subespécie carnosus* (DSMZ 4600 e CECT 4491) (Figura 18E e F) apresentavam crescimentos idênticos a 20°C (116 horas) e 15°C (48/51 horas).

Estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *equorum* seleccionadas

O comportamento das seis estirpes de *Staphylococcus xylosus* (Figura 19 A, B, C, D, E, F) foi semelhante quando sujeitas à temperatura de 10°C, tendo sido evidenciado um decréscimo da concentração às 24 horas para quatro das estirpes estudadas (P06-01, P06-17, P06-97 e P06-102). A estirpe P06-78 evidenciou decréscimo de concentração em cultura às 51 horas enquanto que a estirpe P06-95 ainda evidenciava crescimento às 116 horas.

No que se refere à temperatura de 15°C todas as estirpes, à excepção da P06-78 e P06-95 que manifestaram decréscimo de concentração às 116 horas, tiveram uma diminuição da leitura de densidade óptica às 24 horas.

A 20°C o comportamento das seis estirpes foi menos uniforme. Assim, às 48 horas a estirpe P06-01 apresentou um decréscimo na leitura de DO que se relaciona com a concentração bacteriana em cultura, enquanto que para a estirpe P06-95 essa diminuição apenas foi evidenciada às 56 horas; para as estirpes P06-17 e P06-102 o decréscimo evidenciou-se às 72 horas. As estirpes P06-78 e P06-97 continuaram a evidenciar crescimento com aumento de concentração após 116 horas.

O comportamento das quatro estirpes de *Staphylococcus equorum* (Figura 20 A, B, C, D) revelou-se mais uniforme entre elas do que o constatado para as estirpes de *Staphylococcus xylosus*. Assim, para a estirpe P05-02 houve uma diminuição da sua concentração às 20 horas quando a uma temperatura de 10°C, para as estirpes P05-13 e P05-26 essa redução ocorreu apenas às 48 horas enquanto o crescimento da estirpe P05-74 continuou a ser evidenciado ao fim de 116 horas de incubação. Quando sujeita a 15°C, ao fim de 116 horas de incubação as estirpes P05-02 e P05-13 continuavam a ter crescimento enquanto se notou uma diminuição do valor da densidade óptica na cultura da estirpe P05-26. Esta situação ocorreu mais precocemente para a estirpe P05-74, às 48 horas.

O comportamento das estirpes P05-02 e P05-13 à temperatura de 20°C foi igual ao descrito para a temperatura de 15°C em que o período de tempo da fase de crescimento era superior a 116 horas. No que se refere à estirpe P05-26, constatou-se que o período de crescimento a 20°C era inferior ao observado a 15°C (inferior a 51 horas a 20°C e inferior a 116 horas a 15°C). Situação contrária foi observada na estirpe P05-74 em que o crescimento evidenciado à temperatura de 20°C era superior ao registado à temperatura de 15°C (inferior a 116 horas a 20°C e inferior a 48 horas a 15°C).

3.6.2 – Efeito do pH e temperatura

Estirpes padrão

Para o padrão *Staphylococcus equorum* (DSMZ 20029) (Figura 18A) e, para diferentes condições de pH constatou-se um efeito da temperatura para valores de pH de 5,5, uma vez que a 20°C o decréscimo da população bacteriana ocorreu às 72 horas enquanto aos 15°C esse decréscimo foi evidenciado logo às 24 horas. Idêntica situação ocorreu na condição de pH 5 e temperatura de 15°C. Quando o valor de pH do meio era de 5,0 e a temperatura de 20°C, evidenciou-se uma diminuição da população bacteriana às 146 horas.

Staphylococcus xylosus (ATTC 8166) (Figura 18B) quando sob efeito de um pH 5,0 e a 20°C demonstrou um decréscimo de crescimento populacional a partir das 24 horas, enquanto a 15°C esse decréscimo surgiu apenas às 56 horas o que revela a existência de uma maior adaptação a temperaturas mais baixas. Para a condição de pH 5,5 e temperaturas estudadas observou-se crescimento até às 48 horas.

Para o caso do *Staphylococcus saprophyticus* (DSMZ 18669) (Figura 18C) o decréscimo de crescimento em condições de pH 5,5 a 20°C e pH 5,0 a 15°C foi evidenciado a partir das 51 horas. Às 116 horas constatou-se um decréscimo de concentração da estirpe padrão na condição de pH 5,0 a 20°C.

A estirpe padrão *Staphylococcus simulans* (DSMZ 20323) (Figura 18D) demonstrou ter crescimento até às 48 horas na condição de pH 5,0 a 15°C. Para a condição de pH 5,5 a 15°C o crescimento apenas foi evidenciado até às 51 horas. A pH 5,0 e pH 5,5 a 20°C foi evidenciado um crescimento até às 56 horas.

As estirpes padrão *Staphylococcus carnosus subespécie carnosus* (DSMZ 4600) e (CECT 4491) (Figuras 18E e F) demonstraram um comportamento semelhante na condição de pH 5,0 e temperatura de 20°C e, pH 5,0 e 5,5 na temperatura de 15°C. Na condição pH 5,5 a 20°C estes dois padrões diferiam no seu comportamento demonstrando o *S. carnosus* (DSMZ 4600) uma maior resistência a estas condições uma vez que ao fim de 4 dias ainda evidenciava crescimento.

Estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *S. equorum* seleccionadas

Para o *Staphylococcus xylosus* na condição pH 5,5, o factor temperatura influenciou o seu crescimento. Assim, as estirpes P06-97 e P06-102 (Figura 19 E, F) demonstraram ter um comportamento semelhante apresentando uma diminuição da sua população a partir das 72 horas quando a 20°C e a partir das 24 horas à temperatura de 15°C. A estirpe P06-95 (Figura 19 D) evidenciou diminuição da densidade óptica (DO) da cultura às 51 horas quando sujeita à

temperatura de 20°C e às 48 horas para a temperatura era de 15°C. A estirpe P06-01 (Figura 19 A) continuava a evidenciar, quando submetida a 20°C, crescimento às 146 horas de incubação mas a 15°C a concentração diminuiu após 24 horas. Para a estirpe P06-78 (Figura 19 C) foi constatado decréscimo da DO na cultura a 20°C às 116 horas, havendo quando a temperatura era de 15°C uma redução da população às 48 horas. Relativamente à estirpe P06-17 (Figura 19 B) o comportamento da população bacteriana era idêntico quando a 15° ou a 20°C notando-se o seu decréscimo às 24 horas.

Na condição pH 5,0, o factor temperatura não influenciou o crescimento para cinco das estirpes estudadas, uma vez que o crescimento aos 20°C e 15°C era igual diminuindo após 24h para a P06-01, P06-17, P06-97 e P06-102 e após 48 h para a P06-95. (Figura 19 A, B, E, F e D); a estirpe P06-78 (Figura 19 C) também registou um comportamento semelhante nas duas temperaturas estudadas (ocorrendo decrescimento da população antes das 116 h).

Na condição de pH 5,5, o período de crescimento das quatro estirpes de *Staphylococcus equorum* (Figura 20, A, B, C, D) em estudo foi muito semelhante para a temperatura de 15°C (com decréscimo populacional num período inferior a 51 horas para três das estirpes e inferior a 48 horas para a P05-26); a 20°C o período de crescimento aumentou para a estirpe P05-02 pois ao fim das 116 horas continuava a evidenciar crescimento enquanto para as estirpes P05-26 e P05-74 o crescimento deixou de ocorrer antes das 116 horas. Quanto à estirpe P05-13 não houve diferença significativa no período de tempo de incubação entre a temperatura de 15° e de 20°C (inferior a 48 horas e inferior a 56 horas respectivamente).

Na condição de pH 5,0 não foram observadas diferenças significativas no crescimento das estirpes nas condições 15°C e 20°C.

3.6.3 – Efeito do Cloreto de sódio

Estirpes padrão

Para o padrão *Staphylococcus equorum* (DSMZ 20029) (Figura 18A) evidenciou-se uma diminuição do seu crescimento às 146 horas nos meios com 15% de cloreto de sódio. Já com concentrações de cloreto de sódio de 10% foi evidenciado um decréscimo de concentração a partir das 72 horas.

O comportamento do padrão *Staphylococcus xylosus* (ATTC 8166) (Figura 18B) nas concentrações de 10% e 15% de cloreto de sódio foi semelhante com um decréscimo da concentração às 56 horas.

Para o caso do *Staphylococcus saprophyticus* (DSMZ 18669) (Figura 18C) constatou-se às 116 horas um decréscimo de concentração populacional desta estirpe padrão nas duas concentrações de cloreto de sódio.

A estirpe padrão *Staphylococcus simulans* (DSMZ 20029) (Figura 18D) demonstrou ter crescimento até às 48 horas na condição de 10% de cloreto de sódio, enquanto a 15% de cloreto de sódio o seu crescimento prolongou-se até às 51 horas.

As duas estirpes padrão *Staphylococcus carnosus subespécie carnosus* (DSMZ 4600 e CECT 4491) (Figura 18E e F) apresentavam crescimentos idênticos na concentração de 10% de cloreto de sódio o qual foi evidenciado até às 56 horas. Na condição de 15% de cloreto de sódio o padrão *Staphylococcus carnosus* (DSMZ 4600) demonstrou maior resistência do que o padrão (CECT 4491).

Estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *equorum* seleccionadas

Na condição de diferentes concentração de cloreto de sódio (15% e 10%) o comportamento foi semelhante para três das estirpes: P06-01 (a densidade óptica diminuiu às 72 horas em ambas as concentrações), P06-17 (densidade óptica diminuiu às 56 horas para a concentração de 15% de NaCl e às 72 horas para 10%) e P06-78 (a densidade óptica diminuiu entre as 56 horas e 51 horas para concentrações de 15% e 10% de NaCl respectivamente) (Figuras 19 A, B, C). No que se refere à estirpe P06-95 (Figura 19 D) constatou-se uma maior tolerância a 15% do que a 10% tendo sido evidenciado uma diminuição da concentração a partir das 116 horas para 15%, sendo este período reduzido para 56 horas para concentração de NaCl de 10%. Contrariamente ao descrito anteriormente a estirpe P06-97 (Figura 19 E) apresentava uma maior tolerância na concentração de 10% de NaCl (diminuição do valor de densidade óptica às 146 horas) do que a 15% de NaCl (aumento muito lento do valor de densidade óptica às 24 horas – fase estacionária). A estirpe P06-102 (Figura 19 F) apresentava um comportamento semelhante à estirpe anterior embora com períodos de crescimento exponencial em tempos mais curtos (para os 15% de NaCl com diminuição do valor de densidade óptica às 24 horas e, para os 10% de NaCl às 72 horas).

Na condição de 10 e 15% de cloreto de sódio os resultados foram semelhantes para as estirpes de *Staphylococcus equorum* P05-02, P05-13 e P05-74 (Figura 20 A, B, D) que apresentaram períodos de crescimento inferiores a 116 horas, apresentando apenas a estirpe P05-13 um tempo superior a 116 horas quando a 10% de NaCl. Já para a estirpe P05-26 (Figura 20 C) foi observado uma diminuição da concentração às 51 horas para condições de cloreto de sódio de 10% e às 116 horas para 15% de NaCl.

A Tabela 20 apresenta a evolução da cultura de *Staphylococcus epidermidis* (P06-89) medida em densidade óptica a 625 nm em diferentes condições de temperatura, pH e temperatura e concentração de cloreto de sódio. As condições mais favoráveis para o crescimento desta estirpe foram evidenciadas à temperatura de 20°C e a pH 5,0 também à temperatura de 20°C. Nas restantes condições estudadas houve um decréscimo do crescimento às 51 horas.

Tabela 20- Efeito da temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio da estirpe de *Staphylococcus epidermidis* (P06-89)

	0h	2 h	20 h	24 h	48 h	51 h	56 h	116 h
YTA 10°C	0,101	0,109	0,113	0,155	0,16	0,132		
YTA 15°C	0,079	0,109	0,108	0,18	0,185	0,156		
YTA 20°C	0,08	0,141	0,172	0,277	0,444	0,521	0,605	0,734
YTA pH 5.5 20°C	0,073	0,106	0,115	0,171	0,195	0,193		
YTA pH 5.5 15°C	0,074	0,079	0,08	0,17	0,141			
YTA pH 5.0 20°C	0,061	0,09	0,092	0,146	0,151	0,153	0,176	0,19
YTA pH 5.0 15°C	0,06	0,07	0,075	0,14	0,153	0,131		
YTA 15% NaCl	0,091	126	0,164	0,22	0,359	0,297		
YTA 10% NaCl	0,052	0,081	0,134	0,177	0,327	0,244		

Capítulo IV: Discussão

As estirpes estudadas a partir de isolados provenientes de amostras de superfícies de trabalho e de produto, chouriço, em diferentes fases de fabrico (massa após enchimento, massa após metade do tempo de fumagem e produto acabado) colhidas em duas Unidades Fabris Alentejanas (A e B) pertenciam maioritariamente às espécies *S. xylosus*, *S. equorum* e *S. carnosus*. No que se refere à capacidade de fermentação do açúcar manitol e, considerando os resultados obtidos no dendograma da espécie *Staphylococcus xylosus*, pode-se concluir que as estirpes que evidenciaram fermentação lenta do manitol são idênticas às estirpes que evidenciaram uma fermentação do açúcar mais rápida com a consequente libertação de ácido e passagem do meio de cultura a amarelo. Assim, observou-se que noventa e sete por cento das estirpes de *S. xylosus* identificadas nas duas Unidades Fabris A e B fermentavam o manitol. Esta constatação foi também citada por Devriese, Schleifer & Adegoke (1985) verificando no seu estudo que noventa e três por cento das estirpes de *Staphylococcus xylosus* fermentavam o manitol. Schleifer (1986) referiu serem raras as estirpes desta espécie que não fermentavam o manitol.

Já no que se refere ao *Staphylococcus carnosus* e, considerando os resultados de semelhança entre as estirpes fermentadoras de manitol e as estirpes de redução lenta apresentados no dendograma da espécie constatou-se que apenas 75% dos isolados produziam ácido enquanto no estudo efectuado por Schleifer & Fisher (1982) todas as estirpes estudadas produziam ácido quando em aerobiose a partir do manitol. Do nosso trabalho é interessante o facto de, as três estirpes que não fermentavam o manitol apresentarem uma semelhança, entre si, de cerca de 75% no dendograma da espécie.

A semelhança entre estirpes *Staphylococcus equorum* fermentadoras de manitol e as estirpes de redução lenta não foi tão evidente. As estirpes que não fermentavam o manitol encontravam-se distribuídas por três dos grupos definidos. Ao se ter identificado setenta e sete por cento de estirpes fermentadoras de manitol e vinte e três por cento de não fermentadoras pode-se pressupor, tal como referido por Place, Hiestand, Gallmann & Teubar (2003), a existência de duas subespécies de *Staphylococcus equorum* (subespécie *equorum* e subespécie *linens*). Os referidos autores constataram que cerca de 90% das estirpes da subespécie *equorum* fermentavam o manitol e cerca de 90% da subespécie *linens* não o fermentava.

Sessenta por cento das estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* fermentavam o manitol, percentagem significativamente inferior ao observado por Schleifer (1986). Relacionando a capacidade de fermentação do manitol com os grupos formados no dendograma da espécie constatou-se que as quatro estirpes não redutoras de manitol estão distribuídas por três dos

grupos formados. Assim, supõe-se que estamos perante estirpes de subespécies diferentes. Uma das características que permite distinguir a subespécie *saprophyticus* da subespécie *bovis* é a capacidade de redução do nitrato (Hajek *et al.*, 1996), sendo negativa para a primeira e positiva para a segunda. Relacionando agora a capacidade de fermentação do manitol com a capacidade de redução do nitrato conclui-se que os resultados obtidos contrariam o apresentado por Hajek *et al.* (1996) não só no que se refere ao padrão estudado (*S. saprophyticus* subespécie *bovis* com redução do manitol para amarelo e negativo quanto à actividade nitrato redutase) como também relativamente às estirpes estudadas uma vez que, duas das quatro estirpes não reduziam o manitol e também não reduziam o nitrato.

Quanto às estirpes identificadas como *Staphylococcus epidermidis* conclui-se que nenhuma fermentava o manitol tal como reportado por Shhleifer *et al.* (1975).

Na sequência deste trabalho verificou-se uma diferença significativa entre o resultado obtido na identificação dos isolados pelos métodos fenotípicos e pelos métodos genotípicos sendo já um ponto aceite pela comunidade científica que os métodos que assentam na determinação das características fenotípicas podem levar a identificações incorrectas, não só ao nível da espécie como também ao nível do género especialmente quando as estirpes estão relacionadas com amostras de alimentos (Coppola, Mauriello, Aponte, Moschetti & Villani, 2000). Um ponto fraco dos métodos fenotípicos é a variabilidade na expressão das características fenotípicas dos isolados pertencentes à mesma espécie (Blaiotta, Pennacchia, Parente & Villani, 2003) apresentando os métodos genotípicos, na generalidade, maior sensibilidade e especificidade. Para mais o género *Staphylococcus* que, apresenta um número crescente de espécies que variam entre si em algumas das características fenotípicas tornam mais provável a existência de erros na sua identificação (Coppola *et al.*, 2000).

Quarenta por cento das estirpes identificadas fenotípicamente como *Staphylococcus xylosus* foram identificadas como *Staphylococcus equorum*, *epidermidis*, *carnosus* e *saprophyticus* indo ao encontro do descrito por Blaiotta *et al.* (2004) o que acabou por falsear os resultados obtidos ao longo do tempo quanto ao nº e tipo de estirpe isolada nos produtos cárneos fermentados secos. Blaiotta *et al.* (2003) compararam os resultados obtidos por métodos moleculares com os obtidos por identificação bioquímica tendo reportado uma concordância de cerca de 52%. Os dados obtidos neste estudo indicaram que, ao utilizar apenas métodos de identificação bioquímica, estirpes de *S. equorum*, *S. lentus*, *S. warneri* e *S. saprophyticus* podiam ser incorrectamente identificadas como *S. xylosus*, enquanto estirpes de *S. xylosus* poderiam ser inadequadamente identificadas como *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis* ou *S. intermedius*. No estudo aqui apresentado a concordância obtida entre os dois métodos foi de cerca de 33%.

Nos 104 isolados identificados genotípicamente como pertencentes ao género *Staphylococcus* utilizou-se a metodologia de PCR Multiplex desenvolvida por Morot-Bizot *et al.* (2004), que

associava diversos pares de primers específicos na mesma reacção de amplificação com a finalidade de identificação não só do género *Staphylococcus* como também das espécies *aureus*, *xylosus*, *epidermidis* e *saprophyticus*. A escolha desta técnica baseou-se exactamente na possibilidade de identificação de espécies de *Staphylococcus* presentes nos alimentos e no seu ambiente sendo importante a sua caracterização para uma posterior utilização como culturas *starters* nos enchidos. Através dela foi-nos possível identificar, dos isolados em estudo, 31 *Staphylococcus xylosus* (1 na Unidade Fabril A e 30 na Unidade Fabril B), 10 *Staphylococcus saprophyticus* (9 na Unidade Fabril A e 1 da Unidade Fabril B) e, 6 *Staphylococcus epidermidis* (1 na Unidade Fabril A e 5 na Unidade Fabril B).

Para além das espécies acima referidas seria também importante isolar e identificar outras espécies de *Staphylococcus* com interesse tecnológico ao nível da formação e estabilidade da cor, desenvolvimento do aroma e aumento do tempo vida útil e, que poderiam estar presentes nas matérias-primas ou ingredientes utilizados no processo de fabrico dos enchidos tradicionais ou no seu ambiente de trabalho. Com esse objectivo foi seleccionado um método de PCR espécie específico (Blaiotta *et al.*, 2005) que utilizava dois pares de primers e que permitia identificar e diferenciar o *Staphylococcus simulans* do *Staphylococcus carnosus*, duas das espécies referenciadas por vários autores como podendo ser utilizadas como culturas *starters* sendo mesmo a sua utilização alvo de legislação em Itália (Decreto del 28/12/1994 del Ministero della Sanità). Foram assim identificadas, dos isolados em estudo, 12 estirpes de *Staphylococcus carnosus* (1 na Unidade Fabril A e 11 na Unidade Fabril B) e nenhuma de *Staphylococcus simulans*. Esta espécie tem sido esporadicamente isolada e, em quantidades residuais, nos produtos fermentados italianos (Blaiotta *et al.*, 2004; Mauriello *et al.*, 2004) e franceses (Morot-Bizot *et al.*, 2006).

Uma outra espécie importante e que, durante algum tempo foi identificada como *Staphylococcus xylosus*, é o *Staphylococcus equorum* sendo estimado que a sua presença nos produtos cárneos fermentados do sul de Itália representasse 10 a 40% da população de *Staphylococcus* existentes. Assim, seleccionou-se um método de PCR espécie específico com um par de primers especificamente desenhado para a amplificação do *Staphylococcus equorum* (Blaiotta *et al.*, 2004). Das estirpes identificadas como pertencentes ao género *Staphylococcus* foram identificadas 26 estirpes pertencentes à espécie *equorum* (23 na Unidade Fabril A e 3 na Unidade Fabril B).

Com o objectivo de discriminar estirpes pertencentes a uma mesma espécie foi utilizada a metodologia de PCR fingerprinting através da qual se identificaram grupos de estirpes, por espécie, que, ou evidenciavam uma semelhança de 90% sendo consideradas idênticas ou, evidenciavam semelhança inferior aquele valor não sendo consideradas idênticas. De salientar o facto de, nos dendogramas estudados, as estirpes de referência estarem, regra geral, em grupos separados das estirpes “de campo” o que poderá estar relacionado com o facto das

estirpes de referência serem estirpes de colecção que residem em Laboratório a temperaturas controladas sem o “stress ambiental” que uma estirpe “de campo” está sujeita (Alves *et al.*, 2004). Apesar de inicialmente pensar-se que, através desta metodologia, se poderia identificar e separar subespécies não se conseguiu concretizar este objectivo. A aplicação do PCR fingerprinting permitiu-nos no entanto seleccionar, por espécie, estirpes representativas de cada grupo do dendograma respectivo com vista à determinação das provas de interesse tecnológico.

Analisando a Unidade Fabril A constatou-se que o *Staphylococcus equorum* era a estirpe dominante. Blaiotta *et al.* (2004) estudaram a diversidade dos *Staphylococcus* dos enchidos naturalmente fermentados e constataram que cerca de 10% das estirpes pertenciam à espécie *equorum*. Mauriello *et al.* (2004) estudando outro tipo de enchidos fermentados italianos constataram igualmente que esta espécie podia representar cerca de 40% da microbiota *Staphylococcia* coagulase negativa. De igual modo Morot Bizot *et al.* (2006) identificaram-no como dominante (49%) nos enchidos fermentados produzidos em pequenas Unidades de produção francesa. Esta espécie, tal como referido por Blaiotta *et al.* (2004) era raramente encontrada nos produtos cárneos fermentados devido a situações de incorrecta identificação. No entanto encontra-se frequentemente noutro tipo de alimentos como queijos (Bockeimann, 2002) tendo mesmo sido proposta como cultura starter em queijos e em produtos carneos fermentados devido à sua tolerância ao sal, capacidade de crescimento a várias temperaturas e actividade lipolítica e proteolítica (Leroy *et al.*, 2006). As estirpes de *Staphylococcus equorum* têm sido isoladas da pele de cavalos saudáveis e dos mamilos de cabra, do gato, do homem, de produtos de charcutaria, particularmente do leite e queijo de cabra (Euzeby, 2003) o que justifica a posição dominante desta estirpe uma vez que a Unidade Fabril A era uma unidade de produção com actividade agrícola. As estirpes de *Staphylococcus equorum* foram encontradas na massa após enchimento e no produto final, para além das superfícies de contacto da massa tal como caixa, câmara de refrigeração, máquina de enchimento, faca e mesa. Morot-Bizot *et al.* (2006) reportaram a existência desta espécie no produto e ambiente de três pequenas unidades de produção francesas.

Na massa após enchimento foram identificadas estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* este último fruto de contaminação das superfícies tais como a mesa, enchedora e faca. Lebert, Leroy & Talon (2007) observaram que os *Staphylococcus* coagulase negativa colonizavam todas as superfícies de processamento e equipamentos sendo as facas e mesas as que apresentavam um maior nível de contaminação. A presença do *Staphylococcus xylosus* poderá ter tido origem numa matéria-prima como por exemplo a carne ou a massa de alho o que vai ao encontro do reportado por Lebert *et al.*, 2007, que não observaram evidência de contaminação cruzada entre o ambiente fabril e a matéria-prima, carne, assumindo que a contaminação da massa seria devida, principalmente, à microflora das

matérias-primas e, por vezes, à tripa. Iacumin *et al.* (2006) observaram a existência, em diferentes percentagens, de estirpes de *Staphylococcus xilosus* durante as várias fases de processamento de um enchido naturalmente fermentado italiano tendo sido identificado como a espécie dominante em, duas das três, unidades de processamento italianas estudadas.

No produto acabado foram identificadas estirpes de *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus saprophyticus*. Estirpes de *Staphylococcus equorum* identificadas na massa após enchimento permaneceram após 8 dias de fumagem à temperatura de cerca de 15°C. Este facto é contrariado pelos resultados obtidos nos estudos de efeito de temperatura, pH e % de cloreto de sódio onde se observou, para as 4 estirpes estudadas desta espécie (P05-02, P05-13, P05-26, P05-74) colhidas das superfícies (máquina de enchimento, câmara de refrigeração e caixa) que a concentração da mesma diminuía entre as 48 e 51 horas na condição de pH 5,5 e temperatura de 15°C, condições semelhantes às da fumagem e de armazenamento do produto acabado. Hammes & Hertel (1998) constataram que estirpes de *Staphylococcus equorum* usadas como culturas starter com aplicação na cura dos produtos cárneos cresciam bem a temperaturas inferiores a 10°C. Apenas uma das estirpes estudadas (P05-74) isolada da superfície de uma caixa continuava a evidenciar crescimento ao fim de 116 horas a uma temperatura de 10°C sendo no entanto de salientar que, das 23 estirpes de *Staphylococcus equorum* isoladas na Unidade Fabril A apenas 4 foram sujeitas a ensaios de crescimento a diferentes condições de temperatura, pH e cloreto de sódio.

As estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* presentes no produto final poderão ter sido fruto de contaminação de superfícies de contacto uma vez que esta espécie foi identificada na mesa e na faca tendo-se concluído através do dendograma da espécie (Figura 10) que 4 das estirpes identificadas na faca eram idênticas (P05-70 e P05-20; P0516 e P05-17) dado apresentarem um grau de semelhança superior a 90% e as amostras isoladas no produto acabado terem sido agrupadas no mesmo grupo (I). O *Staphylococcus saprophyticus* tem sido isolado de vários produtos cárneos fermentados do Sul da Europa nomeadamente da Grécia e do Sul de Itália (Baruzzi, Matarante, Caputo & Morea, 2006) sendo mesmo considerado, dentro da família dos *Staphylococcus*, a espécie dominante encontrada num produto cárneo tradicional Espanhol ("Botillo") e no Salame grego (Drosinos, Paramithiotis, Kolovos & Metaxopoulos, 2007).

Para o caso do *Staphylococcus carnosus* a contaminação poderá ter surgido a partir das próprias matérias-primas principais, dado que esta espécie não foi identificada nas superfícies de trabalho ou amostras de ambiente da Unidade Fabril A. Esta espécie tem sido identificada em vários produtos cárneos fermentados em pequenas quantidades (Talon *et al.*, 2007).

Os *Staphylococcus* que não foram identificados em relação à espécie e, presentes no produto acabado, tripa e nas superfícies de trabalho (enchedora, faca e caixa) deverão ser alvo de estudo posterior. A existência de uma estirpe *Staphylococcus epidermidis* presente na superfície do equipamento (picadora) (P06-89) e outra (P06-73) na massa após metade do

tempo de fumagem vai ao encontro dos resultados obtidos nos estudos de efeito de temperatura, pH e % de cloreto de sódio (Tabela 21) o que poderá estar relacionado com outras características que não foram alvo deste estudo como a capacidade de adesividade e de formação de biofilmes e que lhes confere resistência ao *stress* ambiental. Schleifer *et al.* (1975) referiram que o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* era fraco ou mesmo inibido a temperaturas inferiores a 15°C.

Analisando agora a Unidade Fabril B, constatou-se que o *Staphylococcus xylosus* era, do género *Staphylococcus*, a espécie dominante, situação esta já reportada por Martin *et al.* (2006, 2007) e Bonomo *et al.* (2009) para os enchidos italianos e ibéricos e, chouriço espanhol e, para os produtos fermentados secos da região de Bassicalata (Sul de Itália). O *Staphylococcus xylosus* tem sido isolado na pele dos pequenos primatas e outros mamíferos bem como dos seus produtos e ambiente circundante (água, solo) e na pele dos humanos (Schleifer & Kloos, 1975) o que se coaduna com o facto da unidade Fabril B se encontrar inserida numa zona industrial. A massa de chouriço alentejano após enchimento apresentava *Staphylococcus xylosus* (n=14) e *Staphylococcus carnosus* (n=6). A origem destas duas espécies poderá, entre outras possíveis, ter surgido do alho no qual tinha sido identificado a presença destas espécies. No dendograma referente ao *Staphylococcus xylosus* constatou-se que a estirpe P06-13 isolada no alho e as estirpes P06-98, P06-99, P06-100, P06-101, P06-102 e P06-103 colhidas na massa após enchimento eram estirpes idênticas (grau de semelhança superior a 90%). Idêntica situação se verificou no dendograma do *Staphylococcus carnosus* uma vez que as estirpes P06-11 e P06-12 isoladas no alho, foram consideradas idênticas à estirpe P06-104 isolada na massa de chouriço após enchimento. Foi também identificada uma estirpe de *Staphylococcus equorum* com origem, presumivelmente nas matérias-primas utilizadas, uma vez que foi a única estirpe desta espécie identificada nesta Unidade Fabril e, cuja presença continuou a ser evidenciada no produto final (grupo III do dendograma da espécie, Figura 12) resistindo assim ao período de secagem de 10 a 15 dias a cerca de 9°C e ao período de 24 horas de fumagem a cerca de 13°C o que se coaduna com o referido por Hammes & Hertel (1998) nos seus estudos.

A presença de estirpes tolerantes em meio ácido é importante para prevenir o desenvolvimento de microrganismos patogénicos durante a produção dos produtos cárneos fermentados (Bonomo *et al.*, 2009). A massa após metade do tempo de fumagem evidenciava a presença de *Staphylococcus epidermidis* que presumivelmente pode ter tido origem na matéria-prima carne, uma vez que foi também identificada na picadora (mesmo grupo do dendograma da espécie, Figura 11), ou da tripa. Foi também identificada a presença de *Staphylococcus xylosus* o qual já tinha sido identificado não só na matéria-prima alho como também na tripa. Talon *et al.* (2007) assumiram que a contaminação da massa era principalmente devida às matérias-primas e por vezes à tripa. No produto acabado para além do *Staphylococcus*

equorum já referido, constatou-se a presença de *Staphylococcus xylosus* cujas estirpes estudadas (P06-01, P06-17, P06-97, P06-102 e P06-95) nas várias condições de pH e temperatura apresentavam uma diminuição do seu crescimento a pH 5,5 e 5,0 à temperatura de 15°C entre as 24 e as 48 horas (Figura 19) à excepção da P06-78 (isolada da massa após enchimento) que a pH 5,0, temperatura de 15°C continuava a evidenciar crescimento ao fim das 56 horas.

O *Staphylococcus carnosus* também foi identificado no produto final resistindo ao binómio tempo/temperatura e secagem do processo de fabrico. Um único isolado que foi identificado, no alho, como *Staphylococcus saprophyticus*, presumivelmente, não resistiu às condições de fabrico nomeadamente temperatura uma vez que a referida estirpe não voltou a ser identificada. Schleifer & Kloos (1975) referem que, regra geral, as estirpes desta espécie crescem bem a temperaturas entre 15°C e 40°C e algumas delas baixam o pH em meio de extracto de levedura e glucose em condições anaeróbias de 6,8 para 5,0-5,4.

Comparando os perfis genéticos dos isolados por PCR fingerprintings seleccionaram-se quarenta e três estirpes (20 na Unidade fabril A e 23 na Unidade Fabril B) para avaliação das provas de interesse tecnológico. Das oito estirpes (Ver Tabela 10) da espécie de *Staphylococcus equorum* identificadas na Unidade Fabril A apenas 3 (P05-15, P05-21 e P05-74) apresentavam propriedades proteolíticas todas elas isoladas de superfícies de trabalho (faca e caixa). Já no que se refere às propriedades lipolíticas (Ver Tabela 13) apenas uma (P05-74), identificada numa superfície (caixa), evidenciava actividade lipolítica. Quanto à actividade nitrato redutase (Ver Tabela 16), sete das oito estirpes, apresentavam actividade nitrato redutase a 20°C e 15°C. Bonomo *et al.* (2009) reportaram num produto cárneo fermentado da região de Basilicata (Sul de Itália) a existência de 23 estirpes com actividade proteolítica das quais três eram *S. equorum* mas nenhuma delas evidenciava actividade lipolítica. Todas as estirpes de *S. equorum* apresentavam actividade nitrato redutase. Baruzzi *et al.* (2006) observaram fraca actividade lipolítica e proteolítica em estirpes de *Staphylococcus equorum* as quais no entanto evidenciavam capacidade de redução do nitrato. Mauriello *et al.* (2004) encontraram diferente actividade proteolítica e lipolítica também em estirpes de *S. equorum* isoladas de outros produtos cárneos fermentados do Sul de Itália. O baixo nº de estirpes isoladas e os diferentes métodos utilizados para estudar as diferentes propriedades tecnológicas pode explicar a diferença de resultados obtida. De salientar o diferente perfil, em termos de actividade nitrato redutase apresentado pela estirpe isolada na câmara de refrigeração (P05-13) a qual não evidenciava actividade nitrato redutase em nenhuma das temperaturas não sendo também registada actividade proteolítica e lipolítica.

A estirpe de *Staphylococcus carnosus* identificada no produto acabado na Unidade Fabril A apresentava actividade proteolítica, lipolítica e actividade nitrato redutase a 15°C, às 72 horas. Já das três estirpes desta espécie isoladas na Unidade Fabril B apenas numa (P06-14) isolada

do alho, se observou actividade proteolítica e actividade nitrato redutase a 30°C. As restantes (P06-104 e P06-84) não evidenciaram resultados nas três provas de interesse tecnológico estudadas. Montel *et al.* (1996) observaram que, em modelos inoculados com culturas starters de *S. xylosus* e *S. carnosus* se desenvolvia um aroma com altos níveis de 3-metilbutanal, metilcetonas e etilésteres comparativamente com enchidos inoculados com outras *Micrococaceae*. Olesen *et al.* (2004) observaram que o *S. carnosus* desenvolvia, em maior quantidade que o *S. xylosus*, compostos voláteis a partir da degradação da leucina, isoleucina e valina. Talon *et al.* (1999) reportaram para o *S. carnosus* a existência de um resultado de densidade óptica alto em termos de actividade nitrato redutase em condições de anaerobiose e em meios de cultura com a adição de nitrato, reportando igualmente o aumento em cinco vezes da produção de nitrato redutase. De salientar que o produto cárneo fermentado produzido na Unidade Fabril A não tinha nitrato adicionado. Mauriello *et al.* (2004) observaram ser uma característica comum das estirpes de *S. carnosus* a actividade nitrato redutase. Casaburi *et al.* (2005) reportaram que todas as estirpes desta espécie estudadas pelo método do meio de cultura de agar descrito por Miralles *et al.* (1996) eram capazes de hidrolisar as proteínas sarcoplasmáticas mas incapazes de hidrolisar as proteínas miofibrilhares. Já no que se refere à actividade lipolítica Casaburi *et al.* (2005) demonstraram que as estirpes de *S. carnosus* estudadas eram incapazes de hidrolisar a gordura de porco contrariando o observado na estirpe P05-58. Pohja & Niniivara (1964 citado por Patterson, 1966) observaram que estirpes que causavam lipólise da tributerina nem sempre originavam lipólise das gorduras animais o que realça a necessidade de desenvolver um método adequado para a detecção da actividade lipolítica da microbiota presente nos produtos cárneos fermentados.

As cinco estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* isoladas na Unidade Fabril A (P05-16, P05-28, P05-68, P05-95 e P05-97) não apresentavam nem actividade proteolítica nem lipolítica o mesmo acontecendo com a estirpe desta espécie isolada da Unidade B (P06-02). Quanto à actividade nitrato redutase, os resultados foram variáveis apresentando apenas esta característica as estirpes P05-28 e P05-68, isoladas das superfícies (mesa e faca) quando a 15°C ao fim de 72 horas enquanto a estirpe P05-95 isolada do produto acabado apresentava actividade nitrato redutase a 30°C e 20°C contrariamente ao descrito por Mauriello *et al.* (2004). Estes autores observaram que estirpes de *S. saprophyticus* com actividade nitrato redutase eram raras indo ao encontro do constatado para as estirpes P05-16, P05-97 e P06-02, esta última isolada na Unidade Fabril B, que não apresentavam actividade nitrato redutase. Schleifer & Kloos (1975) analisaram oitenta e três estirpes de *S. saprophyticus* não tendo evidenciado actividade nitrato redutase. Bonomo *et al.* (2009) observaram que nas estirpes desta espécie estudadas esta actividade enzimática não era frequente. A ausência de actividade proteolítica e lipolítica nas estirpes em estudo contraria o descrito por Samelis, Metaxopoulos, Vlasasi & Pappa (1998) que observaram, no Salame grego, que o *S. saprophyticus* contribuía para o

desenvolvimento do aroma deste enchido e também por Mauriello *et al.* (2004) que sugeriram que estirpes de *S. saprophyticus* podiam ajudar a prevenir o aparecimento do aroma a ranço durante a maturação. A estirpe de *Staphylococcus epidermidis* isolada na massa após enchimento (P05-91) na Unidade fabril A não possuía actividade proteolítica, lipolítica ou nitrato redutase. Já nas estirpes estudadas na Unidade Fabril B os resultados não foram uniformes. A estirpe P06-44 que evidenciava capacidade nitrato redutase às 3 temperaturas estudadas não possuía actividade proteolítica observando-se lipólise enquanto a estirpe que reduzia o nitrato a nitrito a 15°C P06-89 não evidenciava actividade lipolítica mas sim proteolítica. Para as duas restantes estirpes não se observou capacidade nitrato redutase, sendo a P06-40 negativa em termos de actividade lipolítica e proteolítica e a estirpe P06-73 positiva nas duas propriedades estudadas. Miralles *et al.* (1996) reportaram a capacidade de redução do nitrato a nitrito para uma estirpe de *S. epidermidis*. Apesar de se observar, algumas propriedades tecnológicas que poderiam ser consideradas interessantes para possível integração como cultura starter estas estirpes são conhecidas como sendo patogénicas oportunistas estando envolvidas em muitos processos infecciosos o que não as torna elegíveis para integrar uma cultura starter (Martineau, Picard, Paradis, Roy, Ouellette & Bergeron, 2001).

Das dez estirpes (Ver Tabela 10) de *Staphylococcus xylosus* avaliadas quanto às propriedades tecnológicas, isoladas na Unidade Fabril B, apenas 3 apresentavam propriedades proteolíticas, duas identificadas no produto final e uma na massa após enchimento. Já, no que se refere às propriedades lipolíticas todas as estirpes estudadas evidenciavam esta propriedade. Cinco das estirpes estudadas não apresentavam capacidade de reduzir o nitrato a nitrito ou apresentavam-na de uma forma muito ligeira e as outras cinco estirpes evidenciavam diferentes actividades a 30°C, 20°C e 15°C. Apenas as estirpes P06-01 e P06-95 apresentavam actividade nitrato redutase a 15°C ao fim de 72 horas, assim como a 20°C e a 30°C, condições semelhantes à de produção do chouriço na fase de secagem na Unidade Fabril B. Para as estirpes P06-17 e P06-102 constatou-se a existência desta propriedade a 30°C e 20°C. A estirpe P06-85 isolada na massa após enchimento apenas evidenciava esta actividade a 20°C. Talon *et al.* (1999) observaram uma grande variabilidade no nível da nitrato redutase produzida. Mauriello *et al.* (2004) reportaram que todas as estirpes de *S. xylosus* estudadas eram capazes de reduzir o nitrato a nitrito a 30°C pelo método do agar. Casaburi *et al.* (2005) confirmaram estes resultados pelo método espectrofotométrico com temperatura de incubação de 30°C, no entanto os resultados obtidos a 15°C e 20°C por esta ultima metodologia não confirmavam os resultados obtidos pelo método do agar. Copolla, Iorizzo, Saotta Sorrentino & Grazzia (1997) também observaram estirpes desta espécie com capacidade de reduzir o nitrato a nitrito a 18° e 30°C o que realça a importância de se encontrar um método fiável para a detecção da positividade e intensidade desta propriedade tecnológica. Bonomo *et al.* (2009) reportaram que a maioria (75%) das estirpes desta espécie estudadas

apresentavam actividade nitrato redutase. Aro, Nyam-Osor, Tsuji & Shimada (2009) ao estudarem os perfis proteolíticos de 5 culturas starters inoculadas em produtos cárneos fermentados concluíram que o *S. xylosus* produzia, por si só, maior quantidade de aminoácidos do que os outros starters estudados. Montel *et al.* (1996) observaram que, em modelos inoculados com culturas starters de *S. xylosus* e *S. carnosus* se desenvolvia um aroma com altos níveis de 3-metilbutanal, metilcetonas e etilésteres comparativamente com enchidos inoculados com outras *Micrococaceae*. Garcia-Varona *et al.* (2000) ao caracterizarem a flora *Micrococaceae* isolada de diferentes variedades de “Chorizo” observaram que 68% do *S. xylosus* possuíam actividade proteolítica contudo a maior parte dos isolados tinha baixa actividade proteolítica, à excepção de uma estirpe isolada de um produto cárneo fermentado da Segovia que evidenciou possuir elevada actividade. Mais de 90% dos *S. xylosus* isolados possuíam actividade lipolítica sendo a maior percentagem com um nível moderado à excepção de estirpes isoladas do chouriço curado e semi curado da Segovia.

Através da actividade nitrato redutase os *Staphylococcus* coagulase negativa contribuem para o desenvolvimento de cor, reduzindo o nitrato a nitrito. A presença na massa de estirpes com actividade nitrato redutase confere ao produto uma coloração mais intensa e uniforme. Juntamente com a proteólise, a lipólise está directamente envolvida na formação do aroma durante a maturação dos produtos cárneos fermentados. Os ácidos gordos libertados como resultado das lípases endógenas ou exógenas (com origem na microbiota) são os substratos para as reacções bioquímicas que dão origem à formação de aldeídos e cetonas, precursores dos compostos aroma. Stahnke (1995) propõe a utilização de culturas starter com actividade lipolítica para influenciar, nos produtos cárneos fermentados, o desenvolvimento do aroma.

Através da actividade proteolítica originam-se compostos não-voláteis e voláteis, principalmente pela degradação de aminoácidos livres e pela inibição da oxidação de ácidos gordos insaturados livres os quais participam no desenvolvimento do sabor do produto cárneo fermentado seco pelo que, as estirpes a seleccionar como culturas starters deverão possuir não só a capacidade de redução do nitrato a nitrito (actividade nitrato redutase) particularmente nas condições existentes no processo de fabrico como também actividade lipolítica e proteolítica. Apenas estirpes com características similares, isto é, fraca actividade lipolítica e proteolítica e com actividade nitrato redutase devem ser seleccionadas como culturas starter (Garcia-Varona *et al.*, 2000). Foi observado por [Stahnke *et al.* \(2002\)](#) que a adição de *S. carnosus* como cultura starter diminui o tempo de maturação dos produtos cárneos fermentados italianos em cerca de duas semanas.

Assim, e de acordo com os resultados apresentados anteriormente seleccionariamos como estirpes a introduzir como cultura starter na Unidade Fabril A, a estirpe P05-58 identificada como *Staphylococcus carnosus* e a estirpe P05-74 identificada como *Staphylococcus equorum*.

No que se refere à Unidade Fabril B seleccionaria duas estirpes de *Staphylococcus xylosus*: P06.01 sem actividade proteolítica mas com actividade lipolítica e actividade nitrato redutase e, a estirpe P06-26 com actividade lipolítica, proteolítica e sem actividade nitrato redutase a 20°C e 15°C.

Analisando os resultados obtidos na actividade nitrato redutase, proteolítica e lipolítica obtido para as estirpes padrão e, comparando com as estirpes de campo podemos concluir que, não existe, de um modo geral concordância ou uniformidade, pressuponho que, pela razão de estarmos perante culturas de colecção, não sujeitas ao stress das condições fabris tal como referido anteriormente. Interessante o facto de, as duas estirpes de *Staphylococcus carnosus subespécie carnosus* (DSMZ 4600 e CECT 4491) apresentarem resultados diferentes nas três provas de interesse tecnológico, o que atribuímos ao facto de pertencerem a colecções diferentes.

No trabalho aqui apresentado não foi evidenciada evolução significativa da actividade nitrato redutase, durante a fase exponencial de crescimento em condição estática contrariamente ao referido por Talon *et al.* (1999). De salientar que, a actividade lipolítica e actividade proteolítica das estirpes estudadas não foi influenciada pela concentração da estirpe no meio de cultura nas condições dos ensaios.

Capítulo V: Conclusões e Perspectivas futuras

As 104 estirpes de *Staphylococcus* isoladas neste trabalho foram identificadas como *S. equorum*, *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis* usando as metodologias PCR convencional e PCR *fingerprinting* sendo a primeira dominante na Unidade fabril A e a segunda na Unidade Fabril B.

Das 104 estirpes foram seleccionadas 43 para avaliação das capacidades tecnológicas em termos de actividade nitrato redutase, lipolítica e proteolítica tendo-se concluído que, na generalidade, possuíam características favoráveis ao seu potencial uso como culturas starter em produtos cárneos fermentados com efeitos na melhoria das características organolépticas do produto final.

O crescimento das estirpes seleccionadas (6 *S. xylosus* e 4 *S. equorum*) a diferentes temperaturas, condições de pH e temperatura e, concentração de cloreto de sódio evidenciou que estas estirpes se adaptaram com facilidade ao meio em que estavam inseridas podendo ser utilizadas em processos fermentativos com temperaturas, condições de pH e cloreto de sódio variáveis.

As estirpes de *S. carnosus* P05-58 e *S. equorum* P05-74 da Unidade Fabril A e estirpes de *S. xylosus* P06-01 e P06-26, demonstraram ser, pelas suas características, as mais interessantes do ponto de vista tecnológico para serem utilizadas como flora iniciadora

Os resultados obtidos foram, de um modo geral, interessantes e promissores sendo necessário a sua complementariedade com outros critérios relevantes em termos higiossanitários como a produção de aminas biogénicas e a determinação de propriedades antimicrobianas.

Neste estudo foram identificadas nas duas Unidades fabris um número significativo (n=17) de *Staphylococcus spp* cuja espécie deverá ser identificada bem como avaliadas as suas propriedades tecnológicas e determinada a sua influência na qualidade dos produtos fabricados bem como a presença de propriedades de descarboxilação dos aminoácidos e propriedades antimicrobianas.

Bibliografia

Alves, P.I., Martins, M.P., Semedo, T., Figueiredo, J.J., Tenreiro, R., Crespo, M.T. (2004). Comparison of phenotypic and genotypic taxonomic methods for the identification of dairy enterococci. *Kluwer Academic Publishers Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 237–252

Ankri, S. & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic, *Microbes infect*, 2, 125-129

Aro, J.M.A., Nyam-Osor, P., Tsuji, K., Shimada, K., Fukushima, M. & Sekikawa, M. (2009). The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry*, 1, 1-7

Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M. & Hugas, M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and non pathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4583-4594

Baruzzi, F., Matarante, A., Caputo, L. & Morea, M. (2006). Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. *Meat Science*, 72, 261-269.

Blaiotta, G., Pennachia, C., Ercolini, D., Moschetti, G. & Villani, E. (2003). Combining denaturation gradient electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S-23rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of *staphylococci* from Italian fermented sausages, *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 423-433.

Blaiotta, C., Pennacchia, C., Parente, E. & Villani, E. (2003), Design and evaluation of specific PCR primers for rapid and reliable identification of *staphylococcus xylosus* strains isolated from dry fermented sausages, *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 601-610

Blaiotta, G., Ercolini, D., Mauriello, G., Salzano, G. & Villani, F. (2004). Rapid and reliable identification of *Staphylococcus equorum* by a Species-Specific PCR Assay targeting the *sodA* gene, *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 696-702

Blaiotta, C., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R. & Parente, E., (2004). Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 271-284.

Blaiotta, G., Casaburi, A., Villani, F. (2005). Identification and differentiation of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* by species-specific PCR assays of *sodA* genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 519-526.

Bockelmann, W. (2002). Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheese. *International Dairy Journal*, 12, 123-131

Bonomo, M.G., Ricciardi, A., Zotta, T., Sico, M.A. & Saltzaro, G. (2009). Technological and safety characterization of coagulase-negative *staphylococci* from traditionally fermented sausage of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science*, 83, 15-23.

Casaburi, A., Aristoy, M-Conception., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldra F. & Villani, F. (2007a). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures”, *Meat Science*, 76, 295–307.

Casaburi, A., Blaiotta, G., Mauriello, G., Olimpia, P. & Villani, F. (2005). Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Science*. 71, 643 – 650.

Cocconcelli, P.S. (2007). Starter cultures: bacteria. In F. Toldrá (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*,(pp.137-145), Oxford, UK, Blackwell Publishing Professional.

Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P. & Cantoni, C. (2005). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*, 69, 381–392.

Coppola, R., Iorizzo, M., Saotta, R., Sorrentino, E. & Grazia, L. (1997). Characterization of micrococci and staphylococci isolated from sopressata milsana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiology*, 14, 47-53.

Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, V. & Villani, F. (2000). Microbial sucession during ripening of Naples type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Science*, 56, 321-329.

Decreto-Lei 350/2007 de 19 de Outubro. Diário da República nº202/07-I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa

Decreto del 28/12/1994 del Ministero della Sanità. Autorizzazione all’impiego di culture di avivamento, “starter microbici” nella preparazione degli insaccati carnei da cui tecnologia produttiva non comporti trattamenti col calors. Gazzeta Ufficiale, Serie Generale, N89 del 15/4/1995.

Decreto-lei 33/2008 de 25 de Fevereiro. Diário da República nº39/08-I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa

Demeyer, D. (2004). Meat fermentation: principles and applications – Chapter 20. In Y. H. Hui, L. Meunier-Goddik, A. S. Hansen, J. Josephsen, W.-K. Nip, & P. S. Stanfield, *et al.* (Eds.), *Handbook of food and beverage fermentation technology* (pp. 353–368). New York: Marcel Decker Inc.

Devriese, L.A., Schleiffer, K.H. & Adegoke, G.O. (1985). Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 58, 45-55

Diaz, O., Fernandez, M., Garcia de Fernando, G. D., De la Hoz, L. & Ordonez, J. A. (1997). Proteolysis in dry fermented sausages: The effect of selected exogenous proteases. *Meat Science*, 46, 115–128.

Drosinos, H.E., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I & Metaxopoulos, I. (2007). Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece., *Food Microbiology*, 24, 260 – 270.

Dutra, C.B., Rath, S. & Reyes, F.G. (2007). Nitrosaminas voláteis em alimentos. *Alim. Nutr*, 18, 111-120

- Egana, S.C. (1948). Enciclopédia de la carne. (3ª edição). Espanha: Espasa, Calpe, S.A
- Elias, M., Fraqueza, M.J. & Barreto, A. (2006). Caracterização do processo de fabrico de chouriço tradicional alentejano. *Revista portuguesa de Zootecnia*, XIII (I), 1-12.
- Elias, M., Santos, A., C. & Raposo, B. (2007). Caracterização de matérias-primas subsidiárias usadas no fabrico de paio de porco alentejano. *Revista de Ciências Agrárias*, vol 30, 424-438
- Elias, M. & Carrascosa, A. V. (2010). Characterisation of the Paio Alentejano, a traditional Portuguese Iberian sausage in respect to its safety. *Food Control*, 21, 97-102.
- Erkkilä, S., Petaja, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Matilla-Sandholm, T. & Suihko, M-L. (2001). Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. *Meat Science*, 58, 111-116.
- Euzéby J.P. (2003). Dictionaire de Bacteriologie Veterinaire. Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., Monteiro, M., J., Hogg, T., Gibbs, P. & Teixeira, P.(2007). Chemical and microbiological characterisation of “Salpicão de Vinhais” and “Chouriço de Vinhais”: Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Food microbiology*, 24, 618-623
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Felicio, M., Mena, C., Hogg, T., Gibbs, P. & Teixeira, P.(2007a). Characterisation of alheiras, traditional sausages produced in the North of Portugal with respect to their microbiological safety. *Food Control*. 18, 436-440.
- Flores, J. (1977). Parametros de calidad utilizados para la normalización o tipificación de los productos cárnicos. *Revista Agrop Tecnologia Alimentar*, 17, 444-450.
- Fontana, C., Cocconcelli, P., S. & Vignolo, G. (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 131-142.
- Foremann, J.K. & Goodhead, K. (1975). The formation and analysis of N-nitrosamines. *Journal Science Food Agric*, 26, 1771-1783.
- Fornias, V., F., Diaz, C. V. (1999). Classificacion de los productos cárnicos, *Revista Cubana Aliment Nutri*, 13 (1),63-7.
- Fraqueza, M.J. (1992). Utilização e valoriozação das tripas de animais de abate nas Indústrias de carne Portuguesas. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa.
- Fraqueza, M.J. (2003). “La charcuterie traditionnelle portugaise. Les sailaisons portugaises”. Compte-rendu du 7ème Rencontres Agroalimentaires du Grand Rodez “Les Salaisons du Sud de L’Europe”. Mardi 21 & Mercredi 22 Octobre 2003. Communauté d’Aglomération di Grand Rodez et le Centre Technique de la Viande. Lycée agricole de la Roque. Rodez. France. Comunicação oral.
- Fraqueza, M.J., Elias, M., Talon, R., Aymerich, M.T., Ferreira, M.C. & Barreto, A.S. (2006). Microbiota of traditional dry sausage workshops from south of Portugal. *Actas del Congreso Internacional de Ciencia y Tecnologia de los Alimentos*, Cordoba, Argentina. pp. 197.

Fraqueza, M. J. 2008. Tecnologia de produtos carneos: Ingredientes Texto de apoio às aulas práticas de Tecnologia de produtos animais. 26p.

García-Varona, M., Santos, M., E., Jaime, I. & Rovira, J. (2000). Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 189-195.

Garriga, M., Fadda, S. & Aymerich, T. (2005). Perfil de la microbiota emn equipamiento de empresas tradicionales de embutidos crudo-curados. *Eurocarne*, 149, 1-6

Glória, M.B.A. Amines.(2005). In: HUI, H.; NOLLET, L.L. *Handbook of Food Science*. New York, Marcel Dekker, Cap.13. p.38.

Gøtterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L., H. & Møller, J. K. S. (2007). Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 303–310.

Hajek, V., Meugnier, H., Bes, M., Brun, Y., Fieldler, F., Chmela, Z., Lasne, Y., Fleurette, J. & Freney, J. (1996). *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* subsp. *nov.*, isolated from bovine Nostrils. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 792-796.

Hammes, W., P. & Hertel, C. (1998). New Developments in Meat Starter Cultures. *Meat Science*, 49, SI25-SI38..

Hansen, E.B. (2002). Comercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 119-131.

Hughes, M.C., Kerry, J.P., Arendt, E.K., Kenneally, P.M., McSweeney, P.L.H. & O'Neil, E.E. (2002). Characterization of proteolysis during the ripening of semidry fermented sausages. *Meat Science*, 62, 206-216

Iacumin, L., Comi, G., Contoni, C., Cocolin, L. (2006). Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sal-PCR analysis. *Meat Science*, 74, 281-288.

Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C., Cocolin, L. (2006a). Ecology and dynamics of coagulaase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausage. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 480-486

Janeiro, P. 1948. Noções de salsicharia. *Biblioteca Rural*, 11, 78-117

Juarez, B.M. (2005). Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares, estandarizacion, seguridad y mejora tecnológica. Programa de doutoramento de Ciências, itinerário de Biotecnologia del Departamento de Engenharia Química Agrária/Tecnologia Agro alimentaria. Girona. Universidade de Girona.

Latorre-Moratalla, M., L., Bover-Cid, S., Talon, M., Garriga, M., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.,J., Elias, M., Drosinos, E. & Vidal-Carou, M. C. (2010). Strategies to reduce

biogenic amine accumulation in tradicional sausage manufacturing. *Food Science and Technology*. 43, 20-25.

Lebert, I., Leroy, S. & Talon, R. (2007). Microorganisms in tradicional fermented meats. In F. Toldra (Eds) , *Handbook of fermented meat and poultry*,(pp.113-124), Oxford, UK, Blackwell Publishing Professional.

Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, P., P., Bover-Cid, S., Vidal-Carou, M. C. & Talon, R. (2007). Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science*. 76, 112-122.

Leroy, F., Verhuyten, J.,& De Vuyst, L. (2006), Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food microbiology*, 106, 270-285

Lucke, F.K., (1998), Fermented sausages, En microbiology of fermented foods, Wood, B.J.B. (ed), 441-483, Blackie Academic and professional. Londres, Reino Unido.

Marco, A., Navarro., J. L. & Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science*. 73, 660-673

Martin, R., Garriga, M., Hugas, M., Bower-Cid, S., Veciana-Nogues, M.T. & Aymerich, T, (2006). Molecular technological and safety characterization of gram positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausage, *International Journal of Food Microbiology*, 107, 148-158

Martin, A., Colin, B., Aranda. E., Benito, M. J. & Cordoba, M.G. (2007). Characterization of Micrococacceae isolated from iberian dry cured sausages. *Meat Science*. 75, 696-708.

Martineau, F., Picard, F.J., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M. & Bergeron, M.G. (2000). Development of a rapid PCR assay specific for *Staphylococcus saprophyticus* and application to direct detection from urine samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3280-3284

Martineau, F., Picard, F.J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P.H., Ouellette, M. & Bergeron, M.G. (2001). Development of a PCR assay specific for identification of Staphylococci at genus and species levels. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2541-2547.

Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., & Vilanni, F. (2004).Isolation and technological properties of coagulase negative *staphylococci* from fermented sausages of Southern Italy, *Meat Science*, 67, 149-158

Miller, B.J., Billdeau, S.M. & Miller, D.W. (1989). Formation of N-nitrosamines in microwave versus skillet-fried bacon containing nitrite. *Food Chemistry Toxicology*, 27, 295-299

Miralles, M.C., Flores, J. & Perez-Martinez, G. (1996). Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potencial meat starter cultures. *Food Microbiology*, 13, 1-10

Montel, M. C., Reitz, I., Talon, R., Berdagué, J., L. & Rousset, A., S. (1996). Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology*, 13, 489-499

Moretti, V.,A., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M., A. & Panseri, S. (2004), Chemical and microbiological parameters and sensory attibutes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Science*, 66, 845-854.

Morot Bizot, C., Talon, R., Leroy, S. (2004). Development of a multiplex PCR for the identification of *staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food, *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1087-1094.

Morot Bizot, C., Leroy, S., Talon, R. (2006). Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 210-217.

NP 591 (1969). Norma para enchidos portugueses: salpicão. Definição e características. Documentos impressos. Instituto Português da Qualidade.

NP 589 (2008). Norma para chouriço de carne. Definição, classificação, características e acondicionamento. Documentos impressos. Instituto Português da Qualidade.

NP 4451 (2008). Norma para chouriço. Definição, classificação e acondicionamento. Documentos impressos. Instituto Português da Qualidade.

Ockerman, H.W. & Basu, L. (2007). Production and consumption of fermented meat products. In F. Toldrá (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*,(pp.9-15), Oxford, UK, Blackwell Publishing Professional.

O’Gara, E. A., Hill, D.J. & Maslin, D.J.(2000). Activities of garlic oil, garlic powder, and their dialyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2269-2273

Olesen, P.,T., Meyer, A.S., & Stahnke, L. H. (2004). Generation of flavor compounds in fermented sausages – The influences of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time, *Meat Science*, 66, 675-687

Ordóñez, J., A. & De la Hoz, L. (2007). Mediterranean Products. In F. Toldrá (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*,(pp.333-345), Oxford, UK, Blackwell Publishing Professional.

Patterson, J.T. (1966). Characteristics of *Staphylococci* and *Micrococci* isolated in a bacon curing factory. *Journal Applied Bacteriology*, 29, 461-469

Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R. & Teuber, M. (2003). *Staphylococcus equorum* subespecie *linens*, subespecie nov., a starter culture for surface ripened semi-hard cheeses. *System Applied Microbiology*, 26, 30-37

Portaria 72/2008 de 23 de Janeiro. *Diário da República nº 16/08- I Série*. Ministérios da Economia e da Inovação e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa

Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G. & Cocconcelli, P.S. (1998), Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausages fermentation, *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1043-1049

Ruiz, J. (2007). Ingredients. In F. Toldrá (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*,(pp.59-74), Oxford, UK, Blackwell Publishing Professional.

Rust, R, E. (2007). U.S Products. In F. Toldrá (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*,(pp.303-306), Oxford, UK, Blackwell Publishing Professional.

Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M. & Pappa, A. (1998). Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 69-82

Schleiffer, K.,H. & Kloos, W. E.(1975). Isolation and Characterization of *Staphylococci* from human skin. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25, 50-61

Schleifer, K.H. & Fischer U. (1982). Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 153-156.

Scheifer, K.H. (1986). Gram positive Cocci. Section 2. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.Ed. Sneath P.H.A.. Vol. 2 (pp 999-1035) Williams & Wilkins. USA.

Shuker, D.E.G. (1988). The chemistry of N-nitrosation. *In*: Hill, M.J. Nitosamines: toxicology and microbiology. Chichester: Elias Horwood, 69

Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. *Meat Science*, 41, 179-223

Stahnke, L. H., Holck, A., Jensen, A., Nilsen, A. & Zanardi, E. (2002). Maturity acceleration of Italian dried sausage by *Staphylococcus carnosus*—Relationship between maturity and flavor compounds. *Journal of Food Science*, 67, 1914 –1921.

Suey-Ping Chi & Yun-Chu Wu (2007). Spices and seasonings. *In* F. Toldrá (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*,(pp.87-100), Oxford, UK, Blackwell Publishing Professional.

Talon, R., Alter, D., Chartier, S., Barrière, C. & Montel, M. C. (1999). Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by *staphylococci*. *International Journal of Food Microbiology*. 52, 47-56

Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barrière, C. & Montel, M.C. (1999). Effect of nitrite and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by *Staphylococci*. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 47-56

Talon, R., Giammarinaro, P., Leroy, S., Morot- Bizot, C., Bover-Cid, S., Vidal-Carou, C. (2004). Tradicional fermented meat products : new microbiological aspects. XIV Congresso de Microbiologia de los alimentos, Girona, 19-22, p 21-23

Talon, R., Lebert, I., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E.H., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Patarata, A. & Laukova, A. (2007a). Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia.1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science*, 77, 570-579.

Talon, R., Leroy, S., Lebert, J. (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat product: the importance of indigenous starters, *Meat Science*, 77, 55-62

Tenreiro, R. (2007). 'Curso Teórico e Prático de Diagnóstico e Diferenciação Molecular em Microbiologia- Microbiologia on the road'; Organização: Rogério Tenreiro. Co-organização: Manuela Pintado 'Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa'; Local: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa-Porto.

Tjener, K., Stanke, L.H., Andersen L. & Martinussen, J. (2004). The pH- unrelated influence of salt, temperature and manganeses on aroma formation by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* in a fermented meat model system. *International Journal of Food*

Toldrá, F., Flores, M. & Sanz, Y. (1997). Dry-cured ham flavor: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry*, 59, 523-530.

Toldrá, F. (2007). Biochemistry of meat and fat. In F. Toldrá (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp.51-58), Oxford, UK, Blackwell Publishing Professional.

Tradisausage, 2006. Relatório Final do projecto QLK1 CT-2002-02240 Quality of Life and Management of Living Resources "Assessment and improvement of safety of traditional dry sausages from producers to consumers-TRADISAUSAGE". 30/01/2006. Coordenador do projecto: Talon R. 2006.

Tricker, A.R & Preussmann, R.(1991), Carcinogenic N-nitrosamines in diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potencial. *Mutat. Res. Genetic Toxicology*, 259, 277-289

Truper, H., G. & De Clari, L. (1997). *International Journal Sistematic Bacteriology*, 47, 908

Verluyten, J., Messens, W. & Vuyst, D. L. (2003). Curing agent sodium nitrite, used in the production of fermented sausages is less inhibiting to the bacteriocin-producing meat starter culture *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3833-3839.

Verluyten, J., Leroy, F. & Vuyst, L. (2004). Effects of different spices used in production of fermented sausages on growth of and curvacin A production by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4807-4813

Visier, A., A (1980). Especies, legumbres y frutos usados en la elaboracion de productos cárnicos. In A.A. Visier. *Indústria de la carne*. Brcelona: Editorial Aedos
Visier, A., A (1980). Azúcares en la indústria de la carne. In A.A. Visier. *Indústria de la carne*. Brcelona: Editorial Aedos
Yun-Chu & Suey-Ping Chi (2007). Casings. In F. Toldrá (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp.101-110), Oxford, UK, Blackwell Publishing Professional.

Warriss, P.D., Brown, S.N. 1987. The relationships between initial pH, reflectance and exudation in pig muscle. *Meat Science*, 20, 65-74.